

На правах рукописи

Фахруллин Равиль Фаридович

**ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ И
НАНОЧАСТИЦ**

03.02.03 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Казань - 2011

Работа выполнена в ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан.

Научный консультант:

Член – корр. АН РТ, доктор биологических наук, профессор

Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты:

Член-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор

Ившина Ирина Борисовна

доктор медицинских наук, профессор

Поздеев Оскар Кимович

доктор биологических наук, профессор

Чернов Владислав Моисеевич

Ведущая организация: Ульяновский государственный университет

Защита диссертации состоится «29» сентября 2011 г. в 13⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, КФУ, Главный корпус, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан "___" _____ 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последние годы развитие практически-ориентированных технологий на стыке биологии, физики, химии, электроники и материаловедения привело к формированию нового взгляда на роль микроорганизмов в создании биоаналитических и биоэлектронных устройств, которые уже в ближайшее время могут из прототипных проектов превратиться в рабочие инструменты биомедицины, экологического мониторинга и вычислительной техники.

Микроорганизмы рассматриваются как перспективный объект исследований в области синтетической биологии и биомиметики, междисциплинарных науках, целями которых являются создание искусственной жизни и биоимитирующих материалов и функциональных устройств, соответственно. Достижения синтетической биологии и биомиметики позволяют конструировать новые, основанные на биологических механизмах и процессах, технологии и устройства, применяемые практически во всех областях хозяйственной деятельности человека. Так, генетически модифицированные микроорганизмы могут быть использованы в качестве элементов биосенсоров (Huang et al., 2008), в масштабном производстве рекомбинантных белков и лекарств, а также в выработке биотоплива (Ro et al., 2006; Atsumi et al., 2009), а такие свойства микробных сообществ как, например, чувство кворума, могут быть использованы в логических устройствах и в микроэлектронике (Silva-Rocha, Lorenzo, 2008; Danino et al., 2010). В связи с развитием нанотехнологии как междисциплинарной области исследований, возник особый интерес исследователей к работам, в которых осуществляется комбинация функциональных свойств микробных клеток и наноразмерных структур (нанопленок, наночастиц, квантовых точек, нанотрубок и т.д.) (Berry, Saraf, 2005; Sugunan et al., 2007). В результате были получены и описаны гибридные биоимитирующие системы, состоящие из клеток микроорганизмов и наночастиц (Bai et al., 2009). Предполагается, что такие системы могут быть использованы в качестве электронных микроконтактов (Berry et al., 2005), микропроводов (Li et al., 2003) и средств эффективной терапии онкологических заболеваний (Kuo et al., 2008). Кроме того, модификация клеток микроорганизмов позволяет придать им дополнительные функции, не свойственные исходным, не модифицированным клеткам. Например, искусственный магнетотаксис, обусловленный комбинацией магнитных наночастиц и микробных клеток, обеспечивает осуществление манипуляций с модифицированными клетками в пространстве с использованием внешнего магнитного поля, что, в итоге, дает возможность создания новых сорбентов и ферментативных комплексов на основе микроорганизмов (Safarik et al., 2007). Кроме того, были разработаны методы упорядоченной иммобилизации клеток на поверхностях биоэлектронных устройств (Berry et al., 2004) и созданы прикрепленные к субстратам биопленки (Eun, Weibel, 2009), имеющие строго определенную геометрическую форму. В ряде последних публикаций наблюдается тенденция к переходу от работы с миллиардами клеток к использованию единичных, индивидуальных клеток микроорганизмов (Song et al., 2005), организованных в виде искусственных многоклеточных кластеров (Gupta et al., 2008; Gupta et al., 2010; Regot et al., 2011). Таким образом, функционализация клеток микроорганизмов, то есть контролируемое придание клеткам новых

функциональных возможностей, и создание биоаналитических устройств и упорядоченных многоклеточных кластеров является одним из наиболее перспективных направлений на стыке микробиологии, физической и коллоидной химии, нанотехнологии и биоэлектроники.

В соответствии с вышеизложенным были определены цель и задачи настоящего исследования.

Целью работы стала разработка методологических основ функционализации клеток микроорганизмов с помощью модификации поверхности микробных клеток полимерными нанопленками и наночастицами различной природы и формирования на их основе гибридных биоаналитических систем и упорядоченных многоклеточных кластеров.

Основные задачи исследования:

1. Разработка биосовместимых методов функционализации клеток микроорганизмов при помощи многослойных пленок полиэлектролитов, допированных наночастицами золота, серебра, оксида железа и углеродными нанотрубками.

2. Биомитирующая микроинкапсуляция клеток микроорганизмов при помощи мезопористых неорганических микрооболочек из карбоната кальция.

3. Разработка методов пробоподготовки образцов микроорганизмов для их характеристики при помощи поверхностно-усиленной спектроскопии комбинационного рассеяния (Рамановской спектроскопии).

4. Определение возможности использования функционализированных клеток микроорганизмов в качестве биорецепторных элементов электрохимических биосенсоров и микрофлюидных аналитических устройств.

5. Оценка эффективности использования функционализированных клеток-биорепортеров в анализе токсичности жидких сред.

6. Конструирование трехмерных многоклеточных кластеров определенной геометрии с использованием функционализированных клеток микроорганизмов и неорганических темплатов.

Научная новизна и значимость работы. Разработан универсальный метод функционализации клеток микроорганизмов при помощи функциональных наночастиц, включенных в состав многослойных пленок полиэлектролитов, позволяющий сохранить жизнеспособность клеток. Показано сохранение жизнеспособности и ферментативной активности в функционализированных клетках. Установлено, что некоторые аспекты жизнедеятельности и биохимического состава функционализированных клеток могут быть изучены с использованием спектроскопических и электрохимических методов.

Впервые показан феномен образования микрооболочек из карбоната кальция (фатерита) на поверхности клеток микроорганизмов в процессе копреципитации ионов Ca^{2+} и CO_3^{2-} в водной среде без утраты жизнеспособности инкапсулированных клеток.

Установлено, что функционализация клеток микроорганизмов при помощи биосовместимых полимер-стабилизированных магнитных наночастиц не оказывает ингибирующего воздействия на генотоксин-обусловленный синтез зеленого флуоресцентного белка в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и люциферазы в бактериях *Acinetobacter baylyi*, а также на процесс фотосинтеза в одноклеточных водорослях *Chlorella pyrenoidosa*.

Впервые были получены и охарактеризованы стабильные трехмерные многоклеточные кластеры (названные нами цитозомами), представляющие собой гибридные коллоидные микрочастицы, состоящие из живых клеток дрожжей, включенных в микроскопические полиэлектролитные полые капсулы с определенной и контролируемой геометрической структурой. Морфологическое сходство цитозом с некоторыми примитивными колониальными и многоклеточными организмами, а также простота и широкая распространенность в природе частиц, подобных использованным нами темплатам (микрорекристаллы и микропузырьки воздуха) дает основание предполагать, что аналогичный процесс мог иметь место в эволюционном процессе возникновения многоклеточных организмов.

Практическая значимость работы. Разработан метод иммобилизации широкого спектра наноматериалов на поверхности клеточных стенок микроорганизмов (Патент РФ № 2377310). На основе данного метода разработаны электрохимические биосенсоры для определения общей токсичности среды и гербицидов триазинового ряда с использованием функционализированных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и одноклеточных водорослей *Chlorella pyrenoidosa*. Впервые разработана методика пробоподготовки образцов микроорганизмов путем послойной функционализации единичных клеток с помощью полимерных пленок и наночастиц благородных металлов для их идентификации при помощи Рамановской спектроскопии.

Разработана эффективная методика синтеза стабильных гидрофильных биосовместимых наночастиц (средний диаметр 15 нм) оксида железа. С использованием данных наночастиц в качестве модификаторов поверхности клеток были впервые созданы микрофлюидные биоаналитические устройства для анализа генотоксичности (на основе магнитно-модифицированных клеток дрожжей GreenScreen™) и магнитно-модифицированные клетки-биорепортеры для анализа широкого спектра токсикантов (салициловая кислота, толуол, алканы с различной длиной углеродной цепи) на основе штаммов бактерий *Acinetobacter baylyi* (заявка на Патент Китайской Народной Республики № ZL201010513790.5).

Разработанная методика контролируемого нанесения клеток на поверхности коллоидных частиц позволит оптимизировать методические подходы в создании биологических микрореакторов, а также в тканевой инженерии.

Материалы диссертации используются в лекционных курсах «Основы бионанотехнологии» и «Философские вопросы в биологии» биолого-почвенного факультета Казанского (Приволжского) федерального университета; “Topics in Physical Chemistry” химического отделения университета г. Халл (University of Hull, United Kingdom) и учебном курсе «Основы биологической химии» для студентов специальности «Химическая технология пищевых добавок и косметических средств» в Национальном университете «Львівська Політехніка», Львов, Украина.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный метод функционализации клеток микроорганизмов, основанный на послойном нанесении тонких пленок полиэлектролитов, допированных наночастицами золота, серебра, оксида железа и углеродными нанотрубками, применим для создания новых биоимитирующих систем.

2. Реакция соосаждения ионов CO_3^{3-} и Ca^{2+} из раствора в присутствии клеток микроорганизмов приводит к образованию мезопористых неорганических микрооболочек из карбоната кальция на клеточных стенках.

3. Модификация поверхности микробных клеток функциональными наночастицами (наночастицы благородных металлов, оксида железа, углеродные нанотрубки) позволяет осуществлять характеристику микроорганизмов методом поверхностно-усиленной Рамановской спектроскопии и использовать их в качестве биорецепторных элементов в микрофлюидных и электрохимических биоаналитических устройствах.

4. Микроорганизмы и неорганические темплаты, модифицированные при помощи многослойных полиэлектролитных пленок, образуют трехмерные многоклеточные кластеры (цитозомы), воспроизводящие геометрическую форму темплата и являющиеся гипотетической моделью первичных колониальных микроорганизмов.

Апробация работы. Основные результаты исследований были представлены и обсуждены на ежегодных итоговых научных конференциях Казанского государственного университета (2008-2010 гг.); II и IV международных конференциях «Современные достижения бионаноскопии» (Москва, 2008, 2010); II международной научно-практической конференции "Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии" (Казань, 2008); XII и XIV международных научных молодежных школах "Когерентная оптика и оптическая спектроскопия" (Казань, 2008, 2010); IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008); всероссийской школе для студентов, аспирантов и молодых ученых «Нанотехнологии: проблемы и перспективы» (Белгород, 2010, пленарный доклад), 2nd Saint – Petersburg international conference of NanoBioTechnologies «NanoBio'08» (С.-Петербург, 2008); VIII научной конференции научно-образовательного центра КГУ «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2008); XIII всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем (Казань, 2009); Annual Materials Research Society Fall Meeting (Boston, USA, 2009); XIII международной конференции «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений – V Кирпичниковские чтения» (Казань, 2009); 13th Annual European Symposium «SymBioSE 2009: «Biology: Expansion of Borders» (Kazan, 2009); 14th UK Polymer Colloids Forum Annual Meeting (Hull, United Kingdom, 2009); V Міжнародна конференція "Біологія: від молекули до біосфери" (Харків, Україна, 2010, пленарний доклад); 1st International Conference of Young Scientists "Chemistry and Chemical Technology" (Lviv, Ukraine, 2010, приглашенный доклад); 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Groningen, The Netherlands, 2010).

Место выполнения работы и личный вклад соискателя. Научные положения диссертации и выводы, вытекающие из анализа полученного экспериментального материала базируются на результатах собственных исследований автора. Личный вклад автора состоял в планировании и проведении исследований, анализе, обобщении и интерпретации полученных результатов, их оформлении для публикаций. Экспериментальные данные были получены автором за время работы на кафедрах биохимии и микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Эксперименты по характеристике

клеток с помощью сканирующей электронной микроскопии и Рамановской микроскопии проведены в лаборатории др-а М. Чулха на кафедре генетики и биоинженерии университета Йедитепе (Yeditepe Üniversitesi, Стамбул, Турция). Исследования по созданию цитозом и синтезу магнитных наночастиц проведены в лаборатории др-а В. Паунова на кафедре химии университета г. Халл (University of Hull, Халл, Великобритания). Исследования по магнитной функционализации и характеристике бактериальной биорепортерных клеток осуществлены в лаборатории экологической микробиологии др-а В. Хуанга в Исследовательском институте Крото университета г. Шеффилд (University of Sheffield, Шеффилд, Великобритания).

Связь работы с научными программами. Работа выполнялась в соответствии с темами НИР Казанского (Приволжского) федерального университета: «Механизмы регуляции функциональной активности клетки» и «Исследование биомакромолекул, участвующих в регуляции метаболизма животных и растительных клеток. Разработка нанотехнологических методов определения компонентов». Исследования выполнены при поддержке грантов Правительства Республики Татарстан «Алгарыш» (2006, 2008), Академии наук Республики Татарстан №14/15 (Г)-2009 и РФФИ № 09-04-05079-б, а также персональных стипендий университетов г. Халл, Великобритания (2009, 2010), г. Шеффилд, Великобритания (2010) и университета Йедитепе, Стамбул, Турция (2007, 2008, 2009).

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 49 печатных работ, 18 из которых представлены в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК. Получен патент Российской Федерации и подана заявка на патент Китайской Народной Республики. Также опубликованы: глава в учебно-методическом пособии, 4 статьи в сборниках материалов конференций и 24 тезиса докладов научных конференций.

Объем и структура диссертационной работы. Работа изложена на 340 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц и 133 рисунка. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав, где описаны и обсуждены результаты исследований, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 400 источников и приложения.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы. В работе использовали пищевые дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (Allison), а также рекомбинантные дрожжи *S. cerevisiae* GreenScreen™ (Gentronix Ltd.). Культуру дрожжей поддерживали с использованием стерильных сред, согласно методике фирмы Gentronix Ltd. В геноме дрожжей GreenScreen™ в последовательность промотора гена *RAD54*, кодирующего комплекс ферментов, отвечающих за репарацию ДНК, введен ген, кодирующий экспрессию усиленного зеленого флуоресцентного белка (yEGFP). При взаимодействии дрожжей GreenScreen™ с генотоксичными веществами, вызывающими повреждения ДНК, активизируется синтез ферментов репарации под промотором гена *RAD54*, что инициирует синтез yEGFP, флуоресцирующего при возбуждении клеток светом с длиной волны ~488 нм, при этом интенсивность флуоресценции пропорциональна

концентрации генотоксичного вещества в среде (Van Gompel et al., 2005; Knight et al., 2004). Бактерии *Escherichia coli* и *Staphylococcus cohnii* из коллекции микроорганизмов кафедры генетики и биоинженерии университета Йедитепе культивировали в чашках Петри на питательном агаре (Sigma) в аэробных условиях в течение 24 ч при 37°C. Бактерии *Acinetobacter baylyi* дикого типа и три биорепортерных штамма были получены в лаборатории экологической микробиологии Исследовательского института Крото, университет г. Шеффилд: *A. baylyi* ADP1(BD413) (дикий тип) и 1) *A. baylyi* ADPWH_lux – биорепортер, реагирующий на присутствие в среде салициловой кислоты; 2) *A. baylyi* ADPWH_alk – биорепортер, реагирующий на присутствие в среде предельных углеводов (алканов) и 3) *A. baylyi* ADPWH-Pu-lux-xylR – биорепортер, реагирующий на присутствие в среде толуола. Биорепортерные штаммы *A. baylyi* были получены путем вставки плазмиды pSB417, содержащей ген люциферазы *luxCDABE*: 1) между генами *salA* и *salR*; 2) введенный в последовательность гена *alkM* и 3) между генами *salA* и *salR*, при этом также в ген *salA* был введен ген *xylR*, содержащий собственный промотор. Все гены были расположены на бактериальной хромосоме (Huang et al., 2005). Введенный в генетический аппарат биорепортеров ген люциферазы (*luxCDABE*) обеспечивает биолюминесцентный сигнал клеток в ответ на присутствие в среде экзогенных индукторов, которые взаимодействуют в клетке с регуляторными белками (SalR, XylR или AlkR), приводя к активации промоторов, ассоциированных с геном *luxCDABE*. В результате активации данного гена происходит индуктор-зависимое накопление люциферазы в клетках. Клетки *A. baylyi* культивировали на среде Лурия-Бетани (ЛБ-среда) и минимальной среде. Культуры одноклеточных водорослей *Chlorella pyrenoidosa* и *Dunaliella maritima* выращивали в стеклянных плоскодонных колбах (объем 500 мл) в течение 5 суток при температуре 25°C с периодическим включением освещения и принудительной аэрации. Жизнеспособность микроорганизмов определяли с помощью витальных красителей трипанового синего, диацетата флуоресцеина (Breeuwer et al., 1995), Live/Dead (Sigma), и по числу колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) при посевах клеточных суспензий на агаризованные среды, а для фототрофов – по автофлуоресценции хлорофилла (Chong et al., 2008).

Материалы и реактивы. Для приготовления всех растворов, питательных сред, буферов и для диализа использовали деионизированную воду, очищенную путем обратного осмоса с использованием системы очистки воды MilliQ (Millipore). Основные реактивы: полиаллиламина гидрохлорид (ПАН) (15 кДа и 70 кДа), полистирол сульфонат (PSS) (70 кДа), полиакриловая кислота (ПАА) (3,5 кДа), флуоресцеин изотиоцианат-полиаллиламина гидрохлорид (FITC-ПАН) (16 кДа), флуоресцеина диацетат (ФДА), карбоксиметилцеллюлоза (СМС) и тетраметиламмония гидрохлорид (ТМА) (Sigma-Aldrich и Fluka) использовали без дополнительной очистки.

Методы. Измерения ζ-потенциала клеток и наночастиц, а также гидродинамического диаметра наночастиц проводили на анализаторах Malvern Zetasizer 3000 HS и Zetasizer Nano ZS, оснащенных гелиево-неоновым лазером с использованием стандартных кювет. Кварцевый микрогравиметрический анализ динамики адсорбции полимеров осуществляли с использованием микрогравиметрического анализатора QCM 200 (Stanford Research Systems). Микровесы были оснащены аксиальной проточно-инжекционной ячейкой,

фиксатором резонатора и электронным осциллятором. Использовали кварцевые полированные резонаторы с золотыми электродами, номинальная частота которых составляла 5 МГц. Динамику адсорбции изучали в проточно-инжекционном режиме. В качестве индикаторов изменения массы вещества на границе раздела сред «электрод – раствор полиэлектролита» на поверхности резонатора фиксировали изменения резонансной частоты и сопротивления в реальном времени. Для регистрации аналитических сигналов использовали программу LabView1.0. Для обработки и диспергирования наночастиц, микрочастиц и клеток применяли ультразвуковые зондовые генераторы Branson Digital Sonifier Model 450, с диаметром зонда 5 мм и максимальной мощностью 400 Вт и Bandelin Sonoplus с диаметром зонда 3 мм и максимальной мощностью 250 Вт. Для очистки поверхностей от загрязнений, солюбилизации углеродных нанотрубок и щадящего диспергирования клеток использовали ультразвуковую баню Branson E-1200. Анализ магнитных свойств наночастиц оксида железа и клеток, функционализированных магнитными наночастицами, осуществляли при 300 К с использованием магнитного спектрометра коэрцитивности (Jasonov et al., 1998).

Спектроскопические исследования в ультрафиолетовой и видимой областях спектра проводили с использованием двулучевых сканирующих спектрофотометров Perkin Elmer Lambda 25 и Shimadzu UV 1800. Энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию осуществляли при помощи спектрометра энергодисперсионного рентгеновского анализа INCA 350 EDX фирмы Oxford Instruments, присоединенного к электронному микроскопу. Спектры комбинационного (Рамановского) рассеяния и соответствующие изображения получали с использованием автоматизированного Рамановского микроспектроскопа InVia Reflex (Renishaw), на базе оптического микроскопа Leica и оснащенного светодиодом (830 нм) и аргоновым лазером (514 нм).

Микроскопическое исследование интактных и модифицированных клеток, микрочастиц, интактных и модифицированных микрокристаллов и искусственных многоклеточных систем проводили в белом и поляризованном свете при помощи оптических и конфокальных микроскопов, оснащенных цифровыми CCD видеокамерами (модель указана в скобках). Были использованы прямые микроскопы: Carl Zeiss Jenamed 2 (Webbers MyScope 320M); Carl Zeiss AxioScope A1 (AxioCam MRc5); Carl Zeiss AxioPlan 2 Imager (AxioCam MRc5); Olympus BX 51 (DP 70); Leica DM 1000 (DFC 290) и инвертированные микроскопы Leica DMIL (Leica DFC 420); Olympus IX71 (F-View II); Nikon Eclipse TE 200 (1300 VDS Voskuhler). Конфокальную микроскопию осуществляли при помощи микроскопов Nikon Eclipse TE 2000E, оснащенного системой лазеров Biorad и Leica DMIRE 2, оснащенного системой лазеров Leica. Сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) осуществляли с использованием микроскопов Carl Zeiss EVO 40; Carl Zeiss EVO 50 XVP и Carl Zeiss EVO 60 (с полевой эмиссией). Анализ объектов проводился в режиме низкого вакуума при напряжении 5-20 КэВ. Просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ) осуществляли с использованием микроскопов Jeol 1200 EX и JEM 2011. Для визуализации наночастиц при помощи ПЭМ образцы наночастиц наносили на медные ПЭМ-решетки, покрытые углеродной пленкой. Для подготовки тонких срезов клетки фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом и 1,5% параформальдегидом в фосфатном буфере (0,1 М, рН 7,4) в течение 2 часов при

комнатной температуре и обрабатывали 1% OsO_4 в течение часа. После дегидратации образцы помещали в смолу Epon, с помощью микротомов LKB Ultracut III или Leica EM UC6 получали ультратонкие срезы и устанавливали их на медную решетку с предварительно нанесенной тонкой пленкой формвара. После этого срезы окрашивали 2% водным раствором ацетата урана и цитрата свинца при комнатной температуре. Изображения получали при напряжении 80 КэВ. Атомно-силовую микроскопию (ACM) в полуконтактном режиме осуществляли с помощью микроскопов NT-MDT NTEGRA Prima и Park Systems XE-100, оснащенных сканером на 50 мкм с емкостными датчиками. В работе применяли кремниевые кантилеверы NSG03 и NSG20 с радиусом кривизны острия 10 нм. Электрохимические исследования осуществляли с использованием анализаторов Ecotest-VA и Autolab PGSTAT12. Микрофлюидные многоградиентные чипы были изготовлены по схемам «стекло на стекле» и «полидиметилсилоксан на стекле», перемещение жидкости по микроканалам осуществляли с использованием шприцевых насосов KDS-200CE (Garcia-Alonso et al., 2009).

Синтез и характеристика наноматериалов. Цитрат-стабилизированные наночастицы благородных металлов (золотые наночастицы (AuNC), серебряные наночастицы (AgNC) были синтезированы по методам (Lee et al, 1982) и (Handley, 1989). Наночастицы оксида железа (магнитные наночастицы) синтезировали и стабилизировали с использованием ПАВ ТМА (Lu et al., 2006) и катионного полимера РАН (Fakhrullin et al., 2009). Также были синтезированы флуоресцентно-меченые магнитные наночастицы, стабилизированные FITC-РАН. Солюбилизацию многостенных углеродных нанотрубок (MNWT, Sigma) осуществляли по методу (Panhuis, Raupov, 2005). Синтез микрокристаллов арагонита и кальцита осуществляли в процессе копреципитации эквимольных водных растворов CaCl_2 и Na_2CO_3 (Wang et al., 1999).

Для нанесения полиэлектролитных пленок на поверхность клеточных стенок применяли метод послойного нанесения (Krol et al., 2003). Биолюминесценцию в клетках *A. baylyi* определяли при помощи микропланшетного фотометра Infinite M200 фирмы TECAN Group. Оценку динамики биолюминесценции и построение калибровочных графиков осуществляли при помощи программы Magellan.

Цитозомы получали с использованием в качестве темплатов микропузырьков воздуха и микрокристаллов различной морфологии, на поверхность которых послойно наносили полиэлектролитные пленки, наночастицы и живые функционализированные клетки.

Статистическую обработку осуществляли, используя t-критерий Стьюдента и метод ANOVA Dunnett's T3 post hoc ($p < 0,05$) (с использованием программы SPSS 16.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика синтезированных наноматериалов и микрокристаллов

Золотые и серебряные наночастицы, ТМА-стабилизированные магнитные наночастицы, солюбилизированные многостенные углеродные нанотрубки,

микрокристаллы карбоната кальция и многослойные пленки полиэлектролитов были получены по ранее опубликованным методикам, тогда как РАН-стабилизированные магнитные наночастицы и магнитные микрокристаллы кальцита были получены по впервые разработанным нами оригинальным методикам. Получены (Рис. 1) цитрат-стабилизированные сферические наночастицы: золотые (20 ± 4 нм); серебряные (50 ± 7 нм), ТМА-стабилизированные магнитные наностержни (длина 60 ± 15 нм, ширина 13 ± 3 нм) и РАН-стабилизированные сферические магнитные наночастицы (15 ± 4 нм).

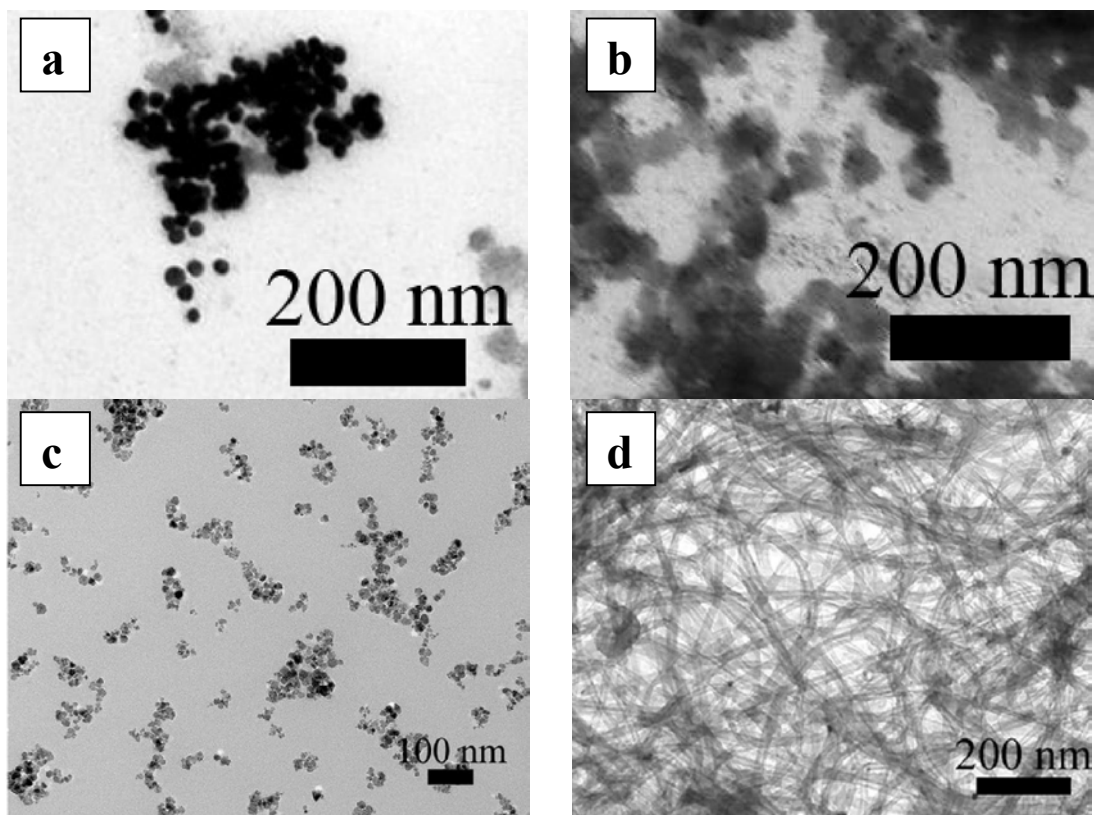


Рис. 1. ПЭМ-микрофотографии (a) - золотых, (b) - серебряных и (c) - магнитных наночастиц; (d) - многостенных углеродных нанотрубок.

Магнитные наностержни и наночастицы обладали суперпарамагнитными свойствами. Средний диаметр многослойных углеродных нанотрубок (по внешнему ободу) составил от 10 до 30 нм, при этом их длина варьировала от 0,1 до 0,5 мкм. При включении наночастиц и углеродных нанотрубок в состав многослойных пленок полиэлектролитов учитывали заряд наноматериалов, чтобы сформировать устойчивую сэндвич-структуру полимер-НЧ-полимер. Значения ζ -потенциала наночастиц и углеродных нанотрубок приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Значения ζ -потенциала (мВ) наночастиц и углеродных нанотрубок.

Объект	AuНЧ	AgНЧ	МНЧ(РАН)	МНЧ(ТМА)	MWNT
ζ -потенциал, мВ	-34 ± 2	-38 ± 2	$+48\pm 5$	-60 ± 4	-35 ± 3

Для определения оптимальных условий нанесения полиэлектролитов на поверхность клеток был изучен процесс формирования многослойных пленок из полиэлектролитов на планарных поверхностях. С помощью кварцевого наногравиметрического анализа установлено оптимальное время адсорбции

полиэлектролитов на противоположно заряженные поверхности (от 5 до 15 мин): для адсорбции РАН потребовалось ~ 5 минут, для PSS и СМС – ~ 15 минут. Адсорбция не зависит от концентрации полимера в диапазоне от 0,5 мг/мл до 10 мг/мл.

2. Функционализация микроорганизмов при помощи полимерных пленок; наночастиц и нанотрубок, включенных в состав полимерных пленок; полимер-стабилизированных наночастиц и мезопористых оболочек из карбоната кальция

2.1. Многослойные пленки полиэлектролитов для модификации поверхностей живых клеток микроорганизмов

Для послойной модификации клеток был использован ряд полимеров: РАН; PSS, СМС, РАА и полиэтиленмин. Наилучшие результаты были показаны для систем, содержащих многослойные пленки РАН, PSS и СМС на поверхности клеток.

Таблица 2. Значения ζ -потенциала интактных клеток микроорганизмов.

Объект	<i>C. pyrenoidosa</i>	Дрожжи GreenScreen™	Дрожжи	<i>E. coli</i>	<i>A. baylyi</i>	<i>S. cohnii</i>
ζ -потенциал, мВ	-18±6	-16±5	-15±3	-24±4	-28±7	-19±3

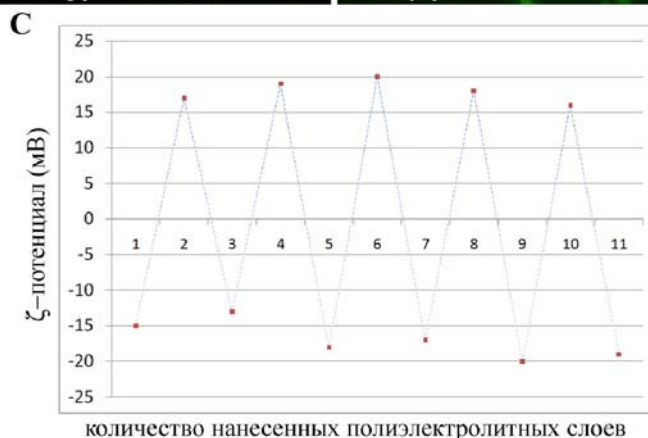
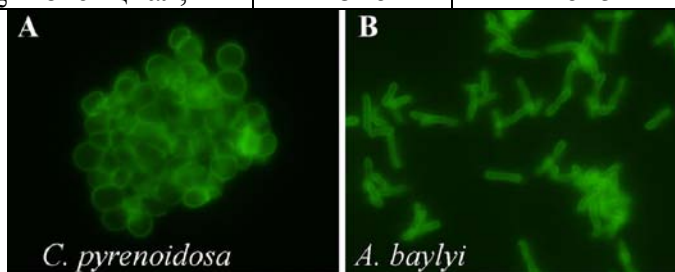


Рис. 2. Микрофотографии клеток, модифицированных при помощи РАН/PSS/РАН/PSS/FITC-РАН/PSS/РАН/PSS: (a) - *C. pyrenoidosa* (a) и (b) *A. baylyi*; (c) – чередующееся изменение ζ -потенциала дрожжей в зависимости от количества полимерных слоев.

Микроорганизмы, использованные в данной работе, обладают отрицательным поверхностным зарядом, что согласуется с опубликованными ранее данными (Veerabadran et al., 2007). Значения ζ -потенциала клеток приведены в **Таблице 2**. Отрицательный поверхностный заряд клеток обуславливает использование поликатиона в качестве первого полимерного слоя при нанесении полиэлектролитов на поверхность клеток. В результате последовательного нанесения формируется полимерная многослойная оболочка. Флуоресцентная микроскопия подтверждает формирование многослойных пленок на поверхности клеток (**Рис. 2, a, b**). Нанесение полиэлектролита на поверхность клеточной стенки приводит к инверсии ζ -потенциала в зависимости от количества слоев (**Рис. 2, c**).

1.2. Модификация микроорганизмов при помощи полиэлектролитных нанопленок и наноматериалов.

Наночастицы благородных металлов. Клетки *S. cerevisiae* модифицировали полиэлектролитами в следующем порядке: РАН/РSS/РАН. Затем клетки, несущие на своей поверхности суммарный положительный заряд, вносили в суспензию наночастиц или многостенных углеродных нанотрубок. После инкубации и отмывки, наносили закрепляющий бислой РАН/РSS.

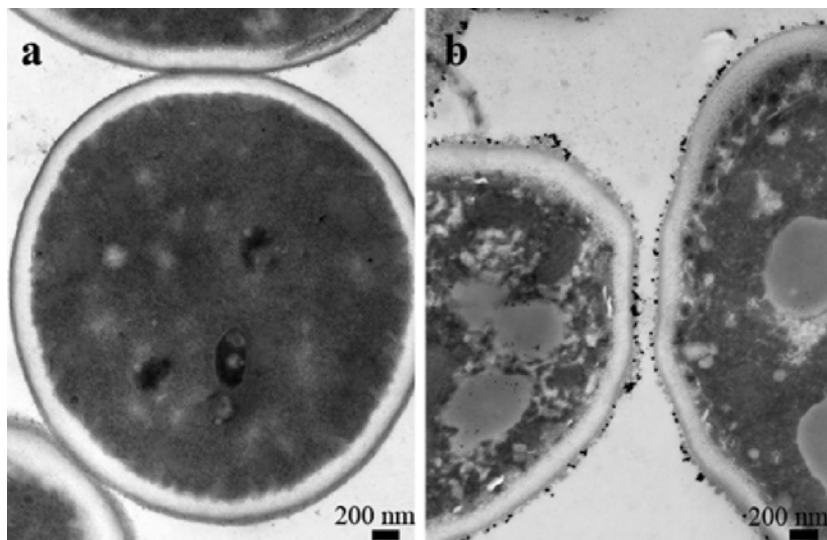


Рис. 3. ПЭМ-микрофотографии дрожжей: (а) интактных; (б) функционализированных полиэлектролитами и золотыми наночастицами.

Для характеристики функционализированных клеток дрожжей, были применены методы ПЭМ, СЭМ и АСМ. На ПЭМ-микрофотографиях клеток дрожжей (**Рис. 3**) четко различимы золотые наночастицы, включенные в полимерные пленки. После иммобилизации полиэлектролитных пленок и наночастиц (обладающих характерной окраской) на поверхности клеток,

можно видеть изменение окраски обработанных наночастицами суспензий *S. cerevisiae*. СЭМ-изображения показывают

неоднородный характер формирования

наноструктурированных

пленок, что может быть

связано с пространственным

строением комплексов

полимеров. На трехмерных

АСМ-изображениях (**Рис. 4**)

интактных клеток видно, что

профиль клеток гладкий и

однородный, однако после

иммобилизации

наноматериалов

значительно увеличивается

шероховатость поверхности

модифицированных клеток,

что вызывает увеличение

поверхностной площади

модифицированных клеток.

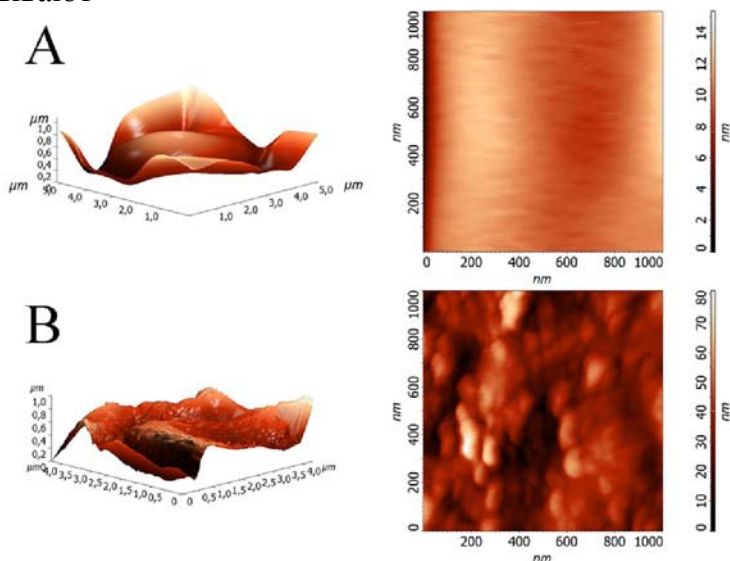


Рис. 4. АСМ-изображения поверхности клеточной стенки дрожжей: (а) интактных; (б) функционализированных полиэлектролитами и золотыми наночастицами.

Изменения параметра шероховатости приведены в **Таблице 3**. Результаты ПЭМ и АСМ исследований подтверждают присоединение к клеточной стенке как единичных наночастиц, так и их агрегатов. Наночастицы прочно прикреплены к поверхности клеточных стенок, при этом не наблюдается их проникновения в цитоплазму. Толщина монослоя составила 25 нм для AuНЧ и 50 нм для AgНЧ.

Таблица 3. Значения параметра среднеквадратичной шероховатости поверхности клеток в зависимости от состава пленочных покрытий.

Параметр среднеквадратичной шероховатости (S_q) поверхности клеток дрожжей, нм		
Интактные:	РАН/PSS/AuНЧ:	РАН/PSS/AgНЧ:
$1,6 \pm 0,1$	$11,5 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,1$

Аналогичные результаты получены с использованием бактерий, отличающихся по форме и биохимическому составу клеточной стенки, а именно грамположительного вида *S. cohnii* и грамотрицательных видов *E. coli* и *A. baylyi*. Микрофотографии клеток *E. coli*, покрытых композитной пленкой РАН/PSS/РАН/AuНЧ/РАН/PSS (**Рис. 5**), демонстрируют присутствие единичных наночастиц и их агрегатов.

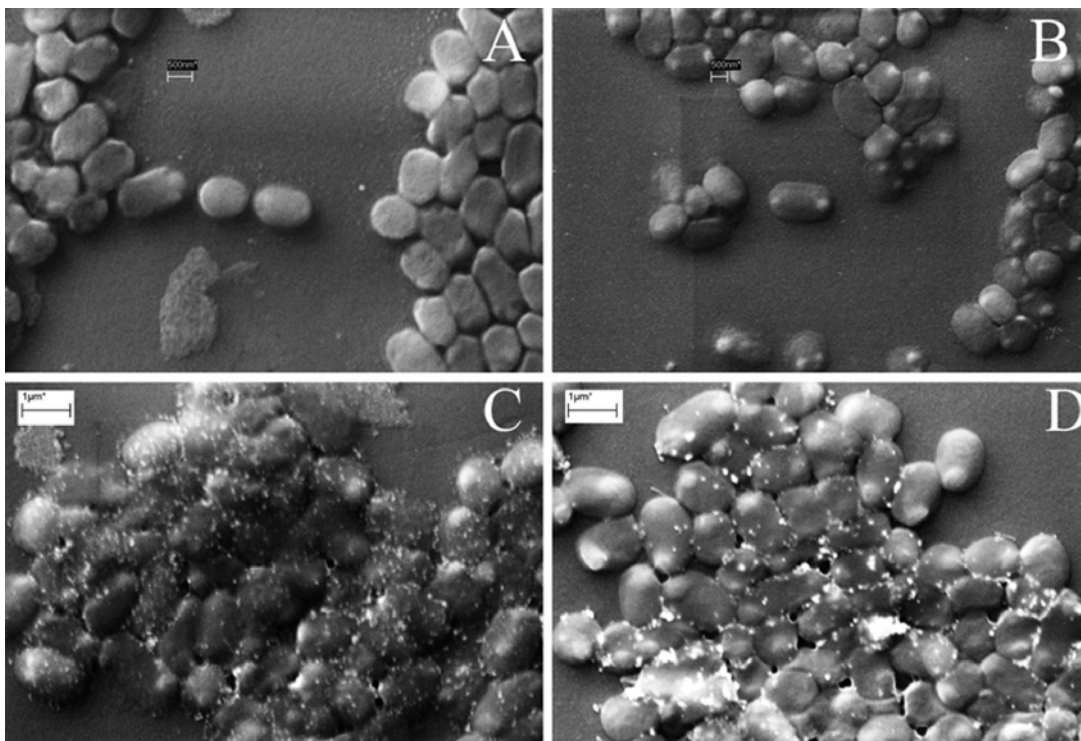


Рис. 5. СЭМ-микрофотографии клеток *E. coli*: (a) – интактных; (b) – покрытых полиэлектролитами РАН/PSS/РАН/PSS/РАН/PSS; (c) – покрытых пленкой РАН/PSS/РАН/AuНЧ/РАН/PSS; (d) – покрытых пленкой РАН/PSS/РАН/AgНЧ/РАН/PSS.

Сравнивая микрофотографии интактных клеток; клеток, модифицированных исключительно полиэлектролитами (РАН/PSS)₃; и клеток, покрытых как полиэлектролитами, так и наночастицами, можно убедиться, что полиэлектролитная пленка сама по себе не обуславливает изменения поверхности клеточной стенки.

Магнитные наночастицы. На **Рис. 6** показаны оптические микрофотографии образцов дрожжей, покрытых композитной нанопленкой РАН/PSS/РАН/МНЧ(ТМА-стабилизированные)/РАН/PSS и intactных клеток. Оптическая микроскопия позволяет достоверно отличить магнитно-модифицированные клетки от intactных по характерному буро-коричневому окрашиванию. Магнитно-модифицированные клетки притягиваются к постоянному магниту и могут быть удержаны при его помощи.

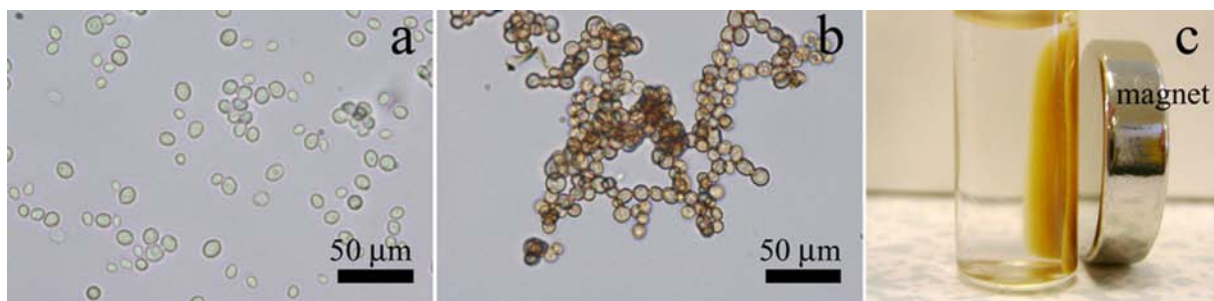


Рис. 6. Оптические микрофотографии (а) intactных клеток дрожжей; (б) клеток дрожжей, модифицированных пленкой РАН/PSS/РАН/МНЧ(ТМА-стабилизированные)/РАН/PSS; (с) магнитные свойства клеток (б), сгруппировавшихся вблизи от постоянного магнита.

На ПЭМ-микрофотографиях (**Рис. 7**) видно формирование тонкой пленки (толщиной 50-80 нм), содержащей магнитные наностержни или сферические наночастицы.

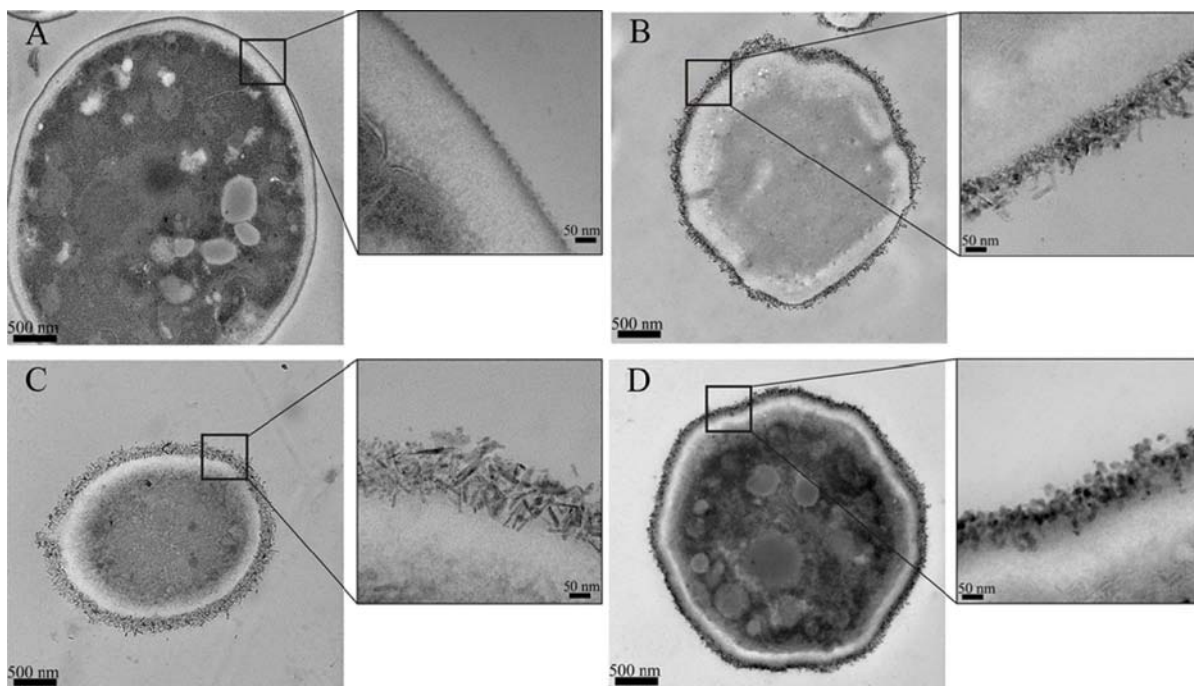


Рис. 7. ПЭМ-микрофотографии (а) intactной клетки дрожжей; (б) – клетки дрожжей, модифицированной пленкой РАН/PSS/РАН/МНЧ(ТМА-стаб.)/РАН/PSS (в присутствии ТМА); (с) - клетки дрожжей, модифицированной пленкой РАН/PSS/РАН/МНЧ(ТМА-стаб.)/РАН/PSS (без ТМА); (д) - клетки дрожжей, модифицированной пленкой РАН/PSS/РАН/PSS/МНЧ(РАН-стаб.) /PSS/РАН/PSS.

Формирование пленки в результате электростатического взаимодействия между полиэлектролитами и наночастицами приводит к визуальному изменению окраски суспензии клеток, отчетливо различимому при оптической микроскопии.

Углеродные нанотрубки. Клетки *S. cerevisiae* модифицировали также с помощью полиэлектролитов (ПАН и PSS) и солюбилизированных многостенных углеродных нанотрубок. На ПЭМ-микрофотографиях (**Рис. 8**), видно, что поверхность клеточной стенки дрожжей после нанесения полиэлектролитных слоев и многостенных углеродных нанотрубок приобретает «ворсистый» вид из-за расположения нитей углеродных нанотрубок на поверхности клеток.

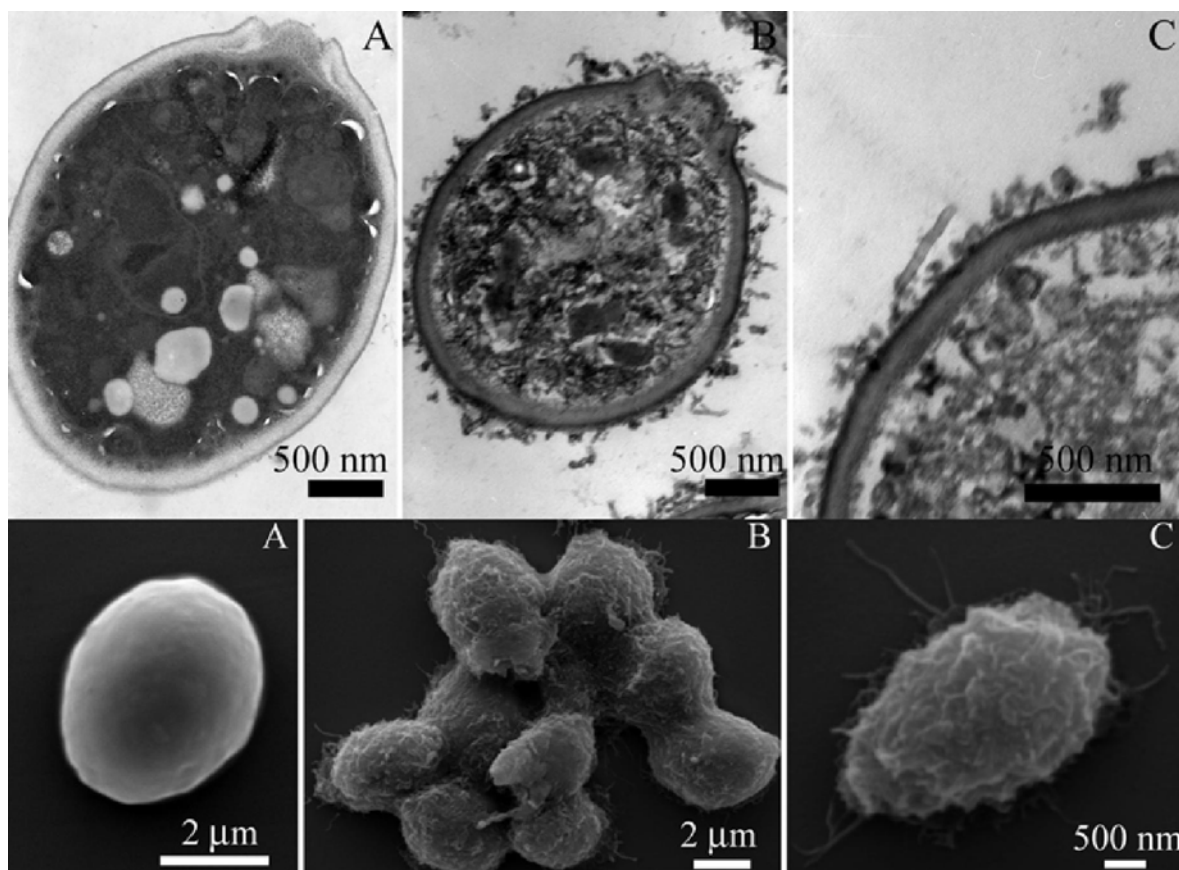


Рис. 8. ПЭМ (верхний ряд) и СЭМ (нижний ряд) микрофотографии клеток дрожжей *S.cerevisiae*: (a) - intactные и (b, c) модифицированные ПАН/PSS/MWNT/ПАН/PSS клетки.

Толщина многослойной пленки, содержащей углеродные нанотрубки, составляет около 80 нм, при этом на микрофотографиях можно обнаружить как более тонкие (20-30 нм), так и более широкие (200 нм) участки, что связано со спонтанным формированием агрегатов углеродных нанотрубок. Нанотрубки ориентированы на поверхности модифицированных клеток хаотично, некоторые из них достаточно плотно прилегают к клеточным стенкам, тогда как другие прикреплены к поверхности лишь частично и направлены наружу. Иммобилизация многослойных углеродных нанотрубок приводит к формированию однородного, равномерного покрытия из нанотрубок и пленок на поверхности дрожжей, которое четко видно при сравнении СЭМ-изображений intactных и модифицированных клеток. Клетки, функционализированные частично прикрепленными углеродными нанотрубками, могут найти применение в качестве микроконтактов в микроэлектронных устройствах (Berry, Saraf, 2005;

Weibel et al., 2007).

2.3. Одностадийная функционализация микробных клеток при помощи РАН-стабилизированных магнитных наночастиц

Послойная модификация предполагает существенные затраты времени на нанесение последовательных слоев полимеров, промежуточные циклы отмывки/центрифугирования и т.д. Интересным представлялось изучить возможность одноэтапного закрепления РАН-стабилизированных магнитных наночастиц на поверхности клеток.

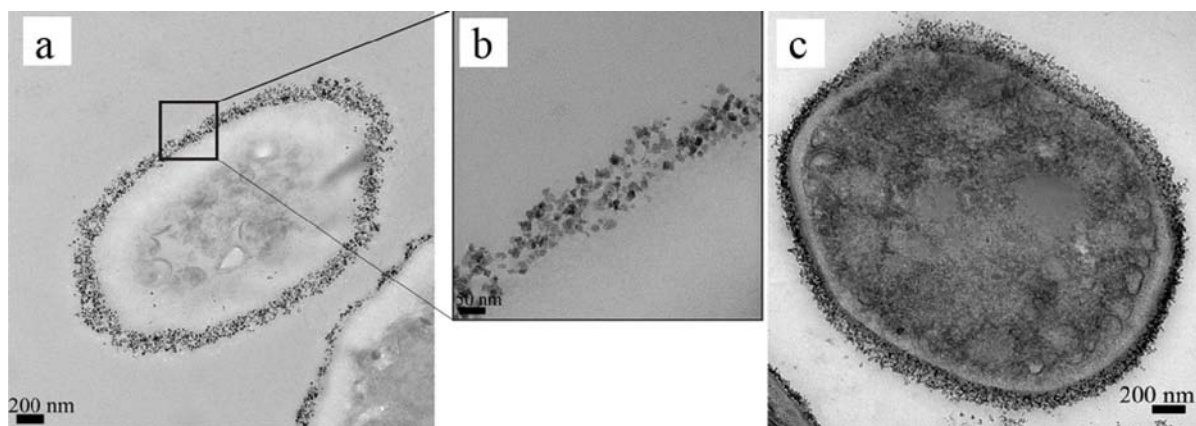


Рис. 9. ПЭМ-микрофотографии клеток дрожжей, модифицированных РАН-стабилизированными магнитными наночастицами, диспергированными в растворе РАН (a) и (b); и в воде (c).

Использовали два типа РАН-стабилизированных наночастиц — диспергированные в растворе свободного РАН и диспергированные в воде. Магнитные свойства клеток, модифицированных при помощи РАН-стабилизированных магнитных наночастиц, соответствовали таковым у образцов, модифицированных при помощи многослойных пленок полиэлектролитов и магнитных наночастиц. Микроскопическая характеристика клеток, модифицированных РАН-стабилизированными наночастицами, показала, что магнитно-модифицированные клетки приобретают характерную буро-коричневую окраску, что согласуется с результатами, полученными с использованием многослойных пленок и ТМА-стабилизированных наночастиц. Ультраструктура дрожжей, модифицированных РАН-стабилизированными магнитными наночастицами, изучена с помощью ПЭМ (**Рис. 9**). Наночастицы формируют на поверхности клеток равномерный слой толщиной около 70 нм. Характер расположения наночастиц не отличается от такового при модификации клеток многослойной пленкой полиэлектролитов. Использование РАН-стабилизированных магнитных наночастиц представляется более удобным, чем магнитная модификация клеток при помощи многослойных пленок полиэлектролитов и наночастиц, включенных в их состав. РАН-стабилизированные магнитные наночастицы были использованы также для магнетизации одноклеточных пресноводных (*C. pyrenoidosa*) и морских (*D. maritima*) зеленых водорослей. После магнитной модификации при помощи РАН-стабилизированных магнитных наночастиц клетки водорослей приобретают бурую окраску в результате присоединения магнитных наночастиц к поверхности

клеток. ПЭМ-микрофотографии тонких срезов магнитно-модифицированных клеток *C. pyrenoidosa* показывают равномерное распределение слоя наночастиц (70-90 нм) на их поверхности (Рис. 10, а). Проникновение наночастиц в цитоплазму магнитно-модифицированных клеток обнаружено не было. Водоросли, модифицированные РАН-стабилизированными магнитными наночастицами, быстро и эффективно реагируют на манипуляции, опосредованные постоянным магнитом.

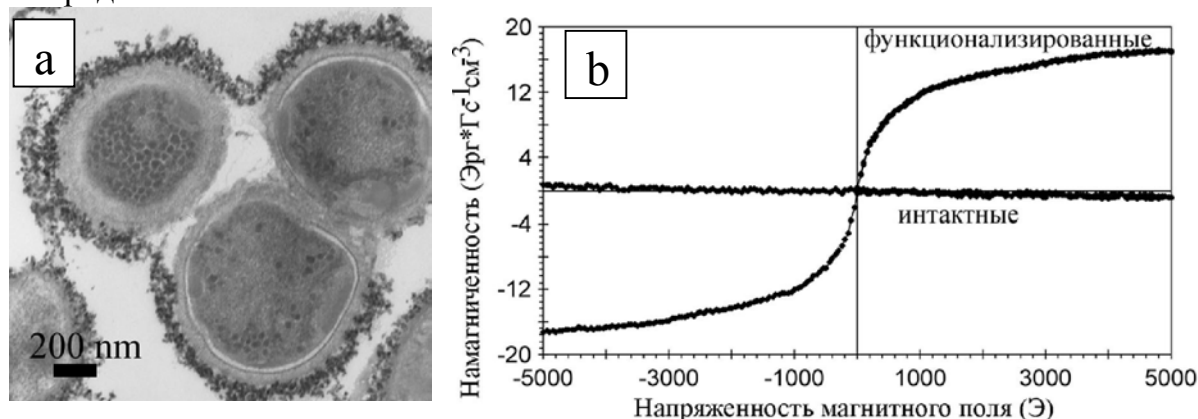


Рис. 10. (а) - ПЭМ-микрофотография клеток *C. pyrenoidosa*, функционализированных РАН-стабилизированными магнитными наночастицами; (б) - кривые изотермической магнетизации магнитно-функционализированных и интактных клеток *C. pyrenoidosa*.

Магнитно-модифицированные клетки *C. pyrenoidosa* обладают суперпарамагнитными свойствами, тогда как интактные водоросли проявляют исключительно диамагнитные свойства (Рис. 10, б).

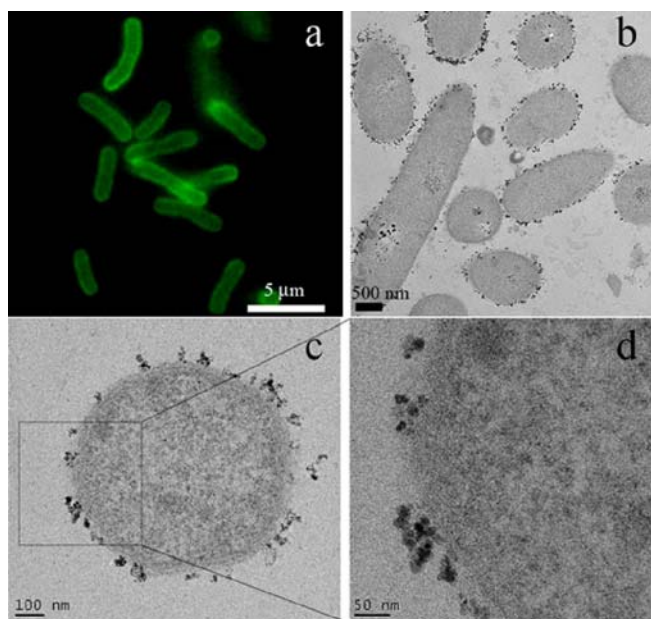


Рис. 11. (а) – микрофотография магнитно-функционализированных клеток *A. baylyi* (FITC-РАН-наночастицы); (b-d) – ПЭМ-микрофотографии магнитно-функционализированных клеток *A. baylyi*.

Также получены магнитно-функционализированные образцы *A. baylyi* дикого типа и биорепортерных штаммов. Магнитные свойства клеток *A. baylyi* не отличались от таковых у описанных ранее клеток дрожжей и водорослей. Анализ данных флуоресцентной и просвечивающей электронной микроскопии (Рис. 11) позволяет установить, что клетки *A. baylyi* покрыты монослоем РАН-стабилизированных наночастиц. В ряде случаев наблюдали присутствие участков клеточной стенки, свободных от наночастиц. Это может быть связано с биохимическими особенностями строения клеточной стенки бактерий.

2.3. Микроинкапсуляция микробных клеток в мезопористые микрооболочки из карбоната кальция

Установлено, что в жидкой среде формируются мезопористые микрооболочки из карбоната кальция на поверхностях живых клеток микроорганизмов, присутствующих в реакционной среде в процессе копреципитации ионов Ca^{2+} и CO_3^{2-} .

Клетки дрожжей вносили в водный раствор Ca^{2+} , после чего осуществляли синтез микрочастиц карбоната кальция путем внесения в среду эквимольного количества ионов CO_3^{2-} . Микроскопическое исследование полученных частиц в поляризованном свете показало, что изотропные частицы практически отсутствовали, однако выявлялись овальные оптически анизотропные микрочастицы, по внешнему виду напоминающие клетки дрожжей (Рис. 12). Подобные структуры были обнаружены только в случае прекращения реакции копреципитации в течение 1-5 мин после смешивания водных растворов ионов Ca^{2+} и CO_3^{2-} . Если реакция продолжалась далее, то микросферы в образцах отсутствовали. Очевидно, что клетки служат центрами кристаллизации на начальных стадиях образования карбоната кальция.

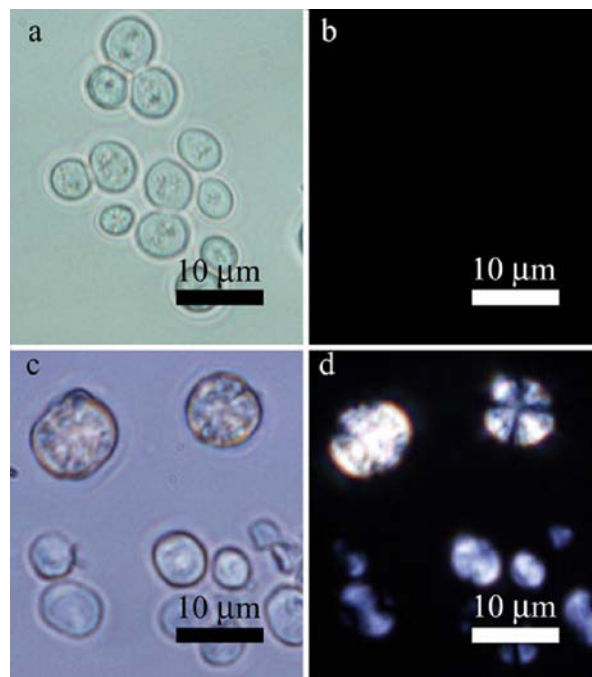


Рис. 12. Оптические микрофотографии в белом свете (слева) и в поляризованном свете (справа) дрожжей (a,b) и клеток, инкапсулированных в мезопористые оболочки карбоната кальция (c,d).

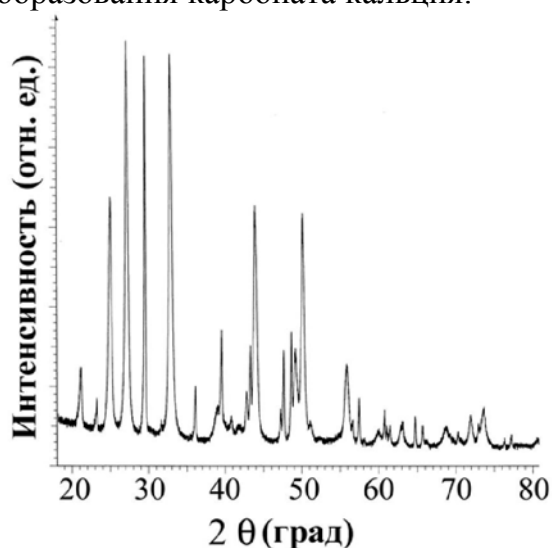


Рис. 13. Рентгеноструктурный анализ гибридных микрокапсул.

Карбонат кальция представляет собой мезопористый (диаметр пор от 2 до 10 нм) материал. Значения ζ -потенциала микросфер (-27 мВ) совпадали с таковыми у микрочастиц карбоната кальция (-28 мВ). При резком понижении pH оптические свойства образца при исследовании в поляризованном свете менялись, при этом суспензия оптически анизотропных микросфер превращалась в суспензию изотропных клеток дрожжей. При растворении микрооболочек с помощью ЭДТА наблюдали почкующиеся клетки.

Образцы клеток, микросфер CaCO_3 и гибридных микрокапсул (после окраски ФДА) изучали при помощи микроскопии в белом свете, в поляризованном свете и в режиме эпифлуоресцентной микроскопии (**Рис. 14**). Интактные клетки обладают характерной ФДА-обусловленной флуоресценцией, однако не визуализируются в поляризованном свете. Микросферы карбоната кальция визуализируются при помощи поляризованной микроскопии, однако их флуоресцентные изображения отсутствуют, так как для активации ФДА-обусловленной флуоресценции необходимы эстеразы.

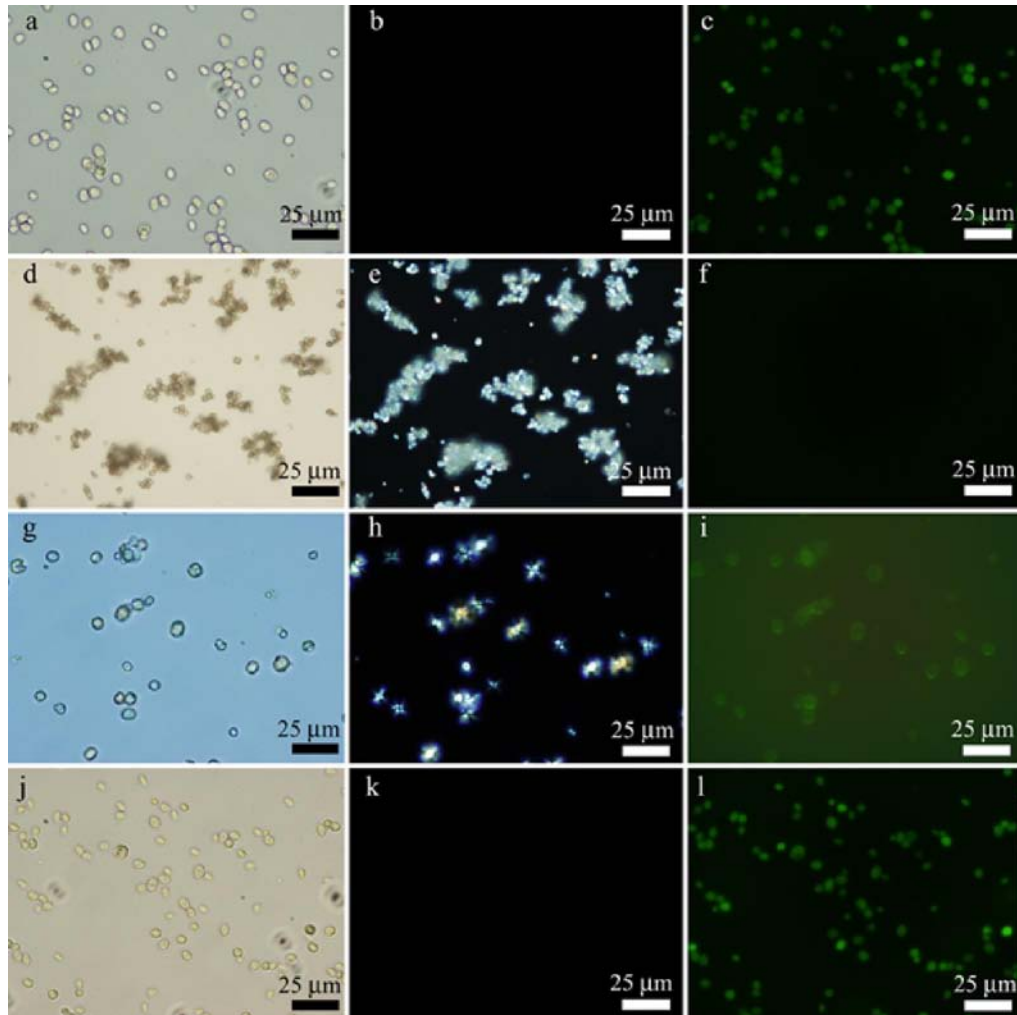


Рис. 14. Микрофотографии в белом свете (дифференциально-интерференционный контраст), в поляризованном свете и в режиме эпифлуоресцентной микроскопии образцов суспензий (после инкубации в присутствии ФДА): (a,b,c) – интактных дрожжей; (d,e,f) – микросфер карбоната кальция, синтезированных в отсутствие клеток; (g,h,i) – микросфер карбоната кальция, синтезированных совместно с клетками (гибридных микрокапсул); (j,k,l) – дрожжей, полученных в результате химической декомпозиции карбоната кальция при помощи ЭДТА.

В образцах гибридных микрокапсул наблюдается как изображение в поляризованном свете (обусловлено кристаллической структурой оболочек), так и флуоресцентное изображение (обусловлено эстеразной активностью инкапсулированных клеток). Суперпозиция поляризационных и флуоресцентных микрофотографий позволяет однозначно локализовать источники света и установить, что клетки инкапсулированы в микрооболочках карбоната кальция.

Анализ изображений клеток, полученных при химическом удалении микрооболочек, подтверждает сделанные выводы. Поступление ФДА внутрь клеток, покрытых микрооболочками карбоната кальция, указывает на их мезопористую структуру. Толщина микрооболочек составляет около 1,5 мкм, при этом соотношение «длина/ширина» остается неизменным, что говорит о сохранении овальной формы клеток дрожжей у гибридных микрокапсул (Таблица 4). СЭМ-микрофотографии (Рис. 15) иллюстрируют разброс размеров и форму гибридных микрокапсул.

Таблица 4. Размеры клеток дрожжей и гибридных микрокапсул.

Объект:	Длина (мкм):	Ширина (мкм):	Длина/ширина:
Дрожжи	5.8 ± 0.7	4.8 ± 0.8	1.21
Гибридные микрокапсулы	7.4 ± 1.4	6.3 ± 1.2	1.17

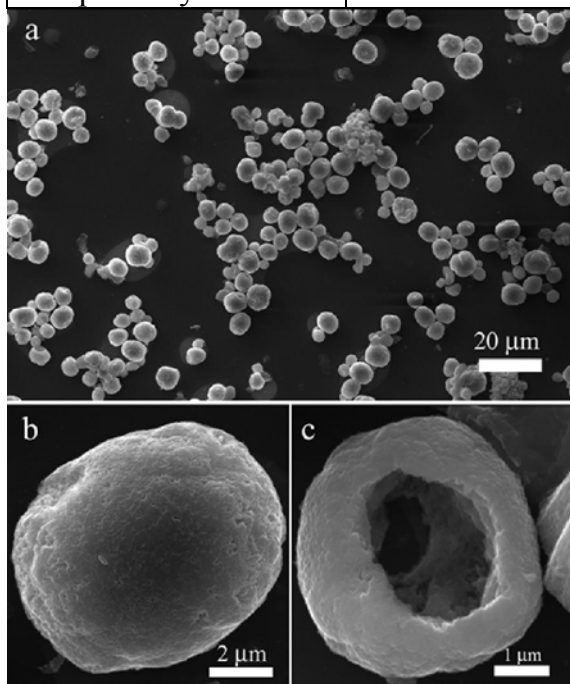


Рис. 15. СЭМ-микрофотографии гибридных микрокапсул.

Частично разрушенная оболочка без клетки (Рис. 15, в) демонстрирует толщину и мезопористую структуру микрооболочек из карбоната кальция.

Анализ результатов рентгеноструктурного анализа (Рис. 13) порошка полученных микрочастиц в сравнении с характерными пиками изоморфов карбоната кальция позволяет заключить, что микрооболочки состоят из фатерита, одной из кристаллических форм карбоната кальция. Фатерит является нестабильной формой, которая достаточно быстро превращается в гораздо более стабильный кальцит, что наблюдается при длительной инкубации гибридных микрокапсул.

2.4. Жизнеспособность функционализированных клеток микроорганизмов

Принципиальным условием успешной функционализации клеток многослойными полиэлектролитными пленками (как таковыми, так и допированными наноматериалами) и полиэлектролит-стабилизированными наночастицами является сохранение жизнеспособности клеток. Ранее было показано, что полиэлектролитные пленки не влияют на жизнеспособность клеток (Klabunde et al., 2001; Diaspro et al., 2002), а металлические наночастицы (Lewinski et al., 2008; Miura et al., 2009; Farkas et al., 2010) и углеродные нанотрубки в определенных условиях цитотоксичны (Isobe et al., 2006; Zhu et al., 2007). Включение наночастиц в структуру многослойной пленки позволяет избежать непосредственного контакта наночастиц с поверхностными

структурами клеток и проникновения наночастиц в цитоплазму, обуславливая сохранение жизнеспособности и физиологической активности функционализированных клеток. Важным свойством полимерных пленок является их способность связывать противоположно заряженные ионы металлов, которые представляют собой основной фактор токсичности наночастиц.

С использованием витального красителя ФДА установлено, что модифицированные полиэлектролитами клетки сохраняют жизнеспособность. Почкующиеся клетки дрожжей, обнаруженные в образцах клеток, модифицированных РАН и СМС, указывают на сохранение способности к размножению у модифицированных клеток. Количество жизнеспособных дрожжей (Рис. 16), *E. coli* и *S. cohnii*, модифицированных многослойными пленками полиэлектролитов и наночастицами или нанотрубками, также не сокращается.

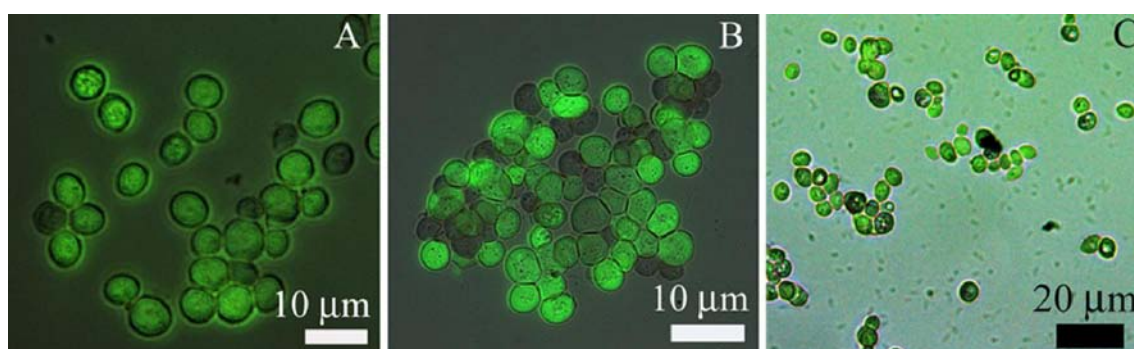


Рис. 16. Микрофотографии (совмещенные изображения в проходящем свете и флуоресцентные) клеток дрожжей, модифицированных (а) - РАН/ПСС/РАН/АuНЧ/РАН/ПСС; (б) - РАН/ПСС/РАН/АgНЧ/РАН/ПСС; (с) - РАН/ПСС/РАН/УНТ/РАН/ПСС.

Анализ микрофотографий модифицированных и интактных клеток позволяет сделать вывод, что процентное соотношение живых и мертвых клеток в образцах совпадает как для наномодифицированных, так и для интактных клеток (Таблица 5).

Таблица 5. Жизнеспособность функционализированных клеток.

Микроорганизм	Жизнеспособные клетки (%)		Функционализация
	Контроль	Опыт	
<i>S. cerevisiae</i>	87±7	88±3	(РАН/ПСС) Au
<i>S. cerevisiae</i>	90±6	92±7	(РАН/ПСС) Ag
<i>S. cerevisiae</i>	89±4	91±4	(РАН/ПСС) УНТ
<i>E. coli</i>	95±2	97±2	(РАН/ПСС) Ag
<i>S. cohnii</i>	90±4	87±5	(РАН/ПСС) Ag

О способности к размножению модифицированных наночастицами дрожжей *S. cerevisiae* свидетельствует большое количество почкующихся клеток в образцах, покрытых как золотыми, так и серебряными наночастицами. Дочерние клетки не несут на своей поверхности наночастицы, из чего можно предположить, что клетки способны разрывать полиэлектролитные оболочки при почковании.

Влияние макромолекул-стабилизаторов магнитных наночастиц на жизнеспособность дрожжей изучали с использованием ФДА (Рис. 17). Магнитно-модифицированные клетки дрожжей сохраняют жизнеспособность во всех случаях, за исключением применения ТМА-стабилизированных наночастиц в присутствии ТМА. Применение наночастиц без предварительной очистки их от остаточных количеств ТМА приводит к гибели магнетизированных клеток (Safarik et al., 2007). Очистка наночастиц от ТМА является трудоемким и слабо контролируемым процессом, приводящим к агрегации наночастиц.

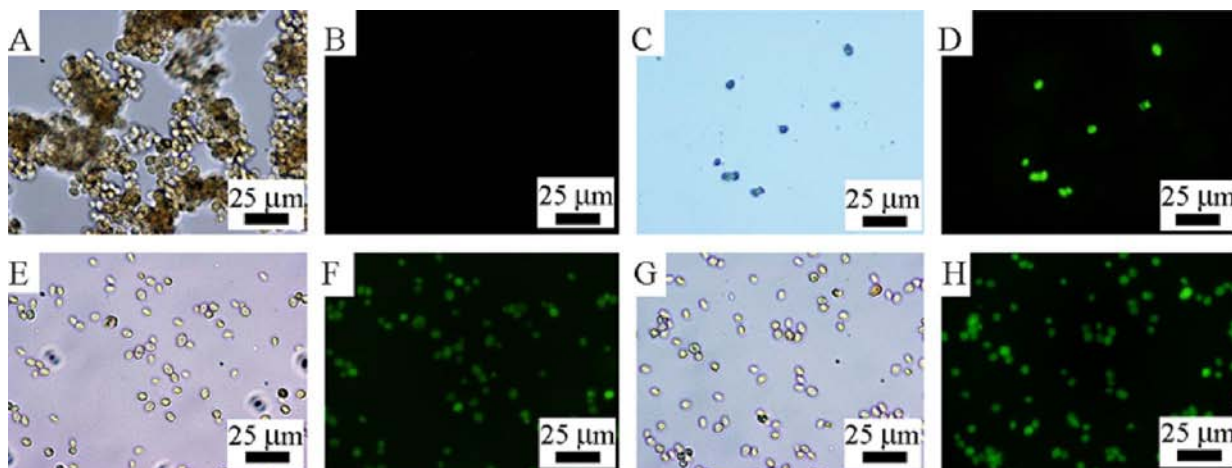


Рис. 17. Оптические и флуоресцентные микрофотографии: (а) и (б) - дрожжей, модифицированных композитной многослойной пленкой РАН/PSS/РАН/МНЧ(ТМА-стабилизированные)/РАН/PSS (в присутствии свободного ТМА); (с) и (д) - дрожжей, модифицированных композитной многослойной пленкой РАН/PSS/РАН/МНЧ(ТМА-стабилизированные)/РАН/PSS (без свободного ТМА); (е) и (ф) - дрожжей, модифицированных композитной многослойной пленкой РАН/PSS/РАН/PSS/МНЧ(РАН-стабилизированные)/PSS/РАН/PSS; (г) (h) - дрожжей, модифицированных РАН-стабилизированными магнитными наночастицами.

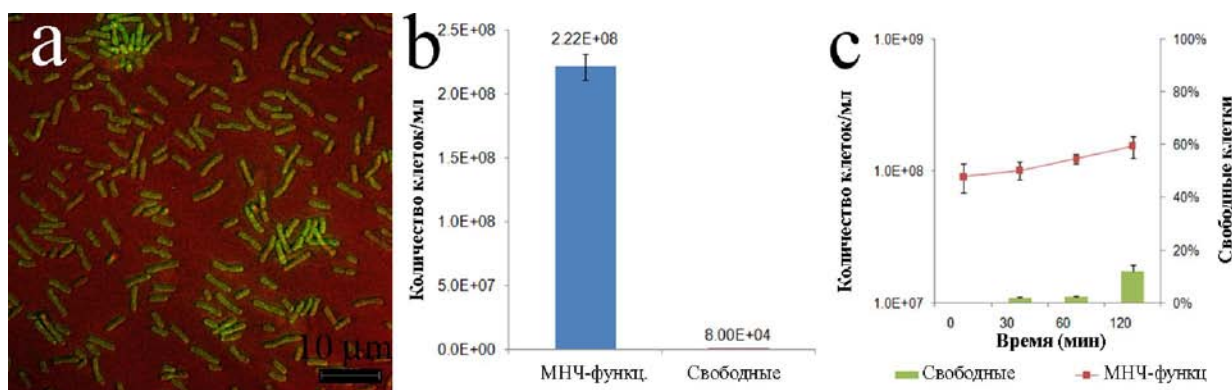


Рис. 18. (а) – Жизнеспособность клеток *A. baylyi*, модифицированных РАН-стабилизированными магнитными наночастицами; (б) – гистограмма, иллюстрирующая жизнеспособность и соотношение магнитных и немодифицированных клеток *A. baylyi*; (с) – кривая роста магнитных и немодифицированных клеток *A. baylyi*.

Жизнеспособность *A. baylyi*, модифицированных при помощи РАН-стабилизированных магнитных наночастиц определяли с использованием ФДА и

по числу КОЕ. Для подсчета клеток использовали две фракции – магнитно-модифицированные и свободные клетки, не реагирующие на постоянный магнит. 99,96% клеток *A. baylyi* были эффективно магнетизированы с сохранением жизнеспособности и способности к образованию колоний. Динамика деления не отличается от таковой у интактных клеток. В результате деления клеток постепенно увеличивается популяция свободных клеток (от 0% до 12% через 2 часа инкубации).

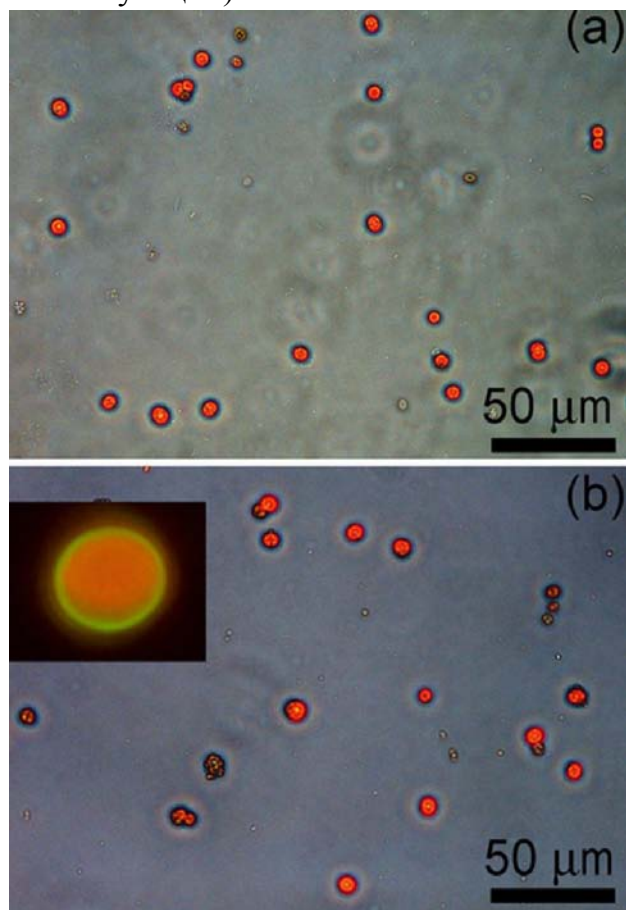


Рис. 19. Микрофотографии (a) – интактных; (b) – функционализированных РАН-стабилизированными магнитными наночастицами клеток *C. pyrenoidosa*.

Жизнеспособность водорослей *C. pyrenoidosa*, модифицированных РАН-стабилизированными магнитными наночастицами, определяли по автофлуоресценции водорослей при возбуждении светом $\lambda=540$ нм, что соответствует максимуму поглощения хлорофилла В (Chong et al, 2008). Магнитная функционализация клеток водорослей не оказала отрицательного эффекта на их жизнеспособность (**Рис. 19**). Было установлено, что $85\pm4\%$ магнитно-модифицированных клеток *C. pyrenoidosa* сохраняют жизнеспособность, что согласуется с данными по жизнеспособности интактных клеток ($87\pm3\%$). На вставке (**Рис. 19, b**) приведена микрофотография, иллюстрирующая жизнеспособность изолированной клетки, покрытой FITC-РАН-стабилизированными магнитными наночастицами, обуславливающими зеленый флуоресцентный ободок по краям клетки.

3. Функционализированные микроорганизмы как компоненты биоаналитических устройств

3.1. Характеристика микроорганизмов с использованием поверхностно-усиленной Рамановской спектроскопии

Характеристика микроорганизмов с помощью поверхностно-усиленной Рамановской спектроскопии (Otto, 1999) является одним из важных направлений в анализе микроорганизмов. Применительно к микроорганизмам имеется существенное ограничение – для эффективного анализа необходимо достаточно большое количество исследуемого образца, что делает невозможным получение информативного сигнала от единичных клеток. Преодолеть это ограничение

позволяет поверхностно-усиленная Рамановская спектроскопия (SERS). В качестве усилителей применяют наночастицы благородных металлов, поверхностные плазмоны которых взаимодействуют с электромагнитным излучением и усиливают интенсивность сигнала Рамановского спектра (Goeller, Riley, 2007). Наночастицы должны находиться в непосредственной близости от объекта. Пробоподготовка является важным этапом SERS-анализа (Tang et al., 2007; Kneipp et al., 2009).

Непосредственное смешивание наночастиц и клеток (Premasari et al., 2005) приводит к неравномерному распределению наночастиц и агрегации клеток (Kahraman et al., 2008). Функционализация клеток при помощи полимеров и наночастиц позволяет избежать агрегации. В качестве модельных объектов использовали

функционализированные бактерии *E. coli* и *S. cohnii*. Были изучены два подхода к модификации поверхности клеток бактерий: 1) на поверхность клеток наносили многослойную пленку PАН/PSS/PАН/AgНЧ/PАН/PSS или PАН/PSS/PАН/AuНЧ/PАН/PSS; 2) на поверхность клеток наносили многослойную пленку PАН/AgНЧ/PАН или PАН/AuНЧ/PАН. Установлено, что SERS-спектры клеток *E. coli*, модифицированных как первым, так и вторым способом, содержат характерные спектральные пики. Применение пленок PАН/AgНЧ/PАН или PАН/AuНЧ/PАН позволяет получить более интенсивный SERS-спектр, чем при использовании пленок PАН/PSS/PАН/AgНЧ/PАН/PSS или PАН/PSS/PАН/AuНЧ/PАН/PSS. Наибольшая интенсивность сигнала наблюдается для клеток, модифицированных PАН/AgНЧ/PАН.

Анализ SERS-спектров (Рис. 20) выявил характерные отличия в спектральных линиях клеток. Возникновение пика при 730 см^{-1} обусловлено Раман-активностью

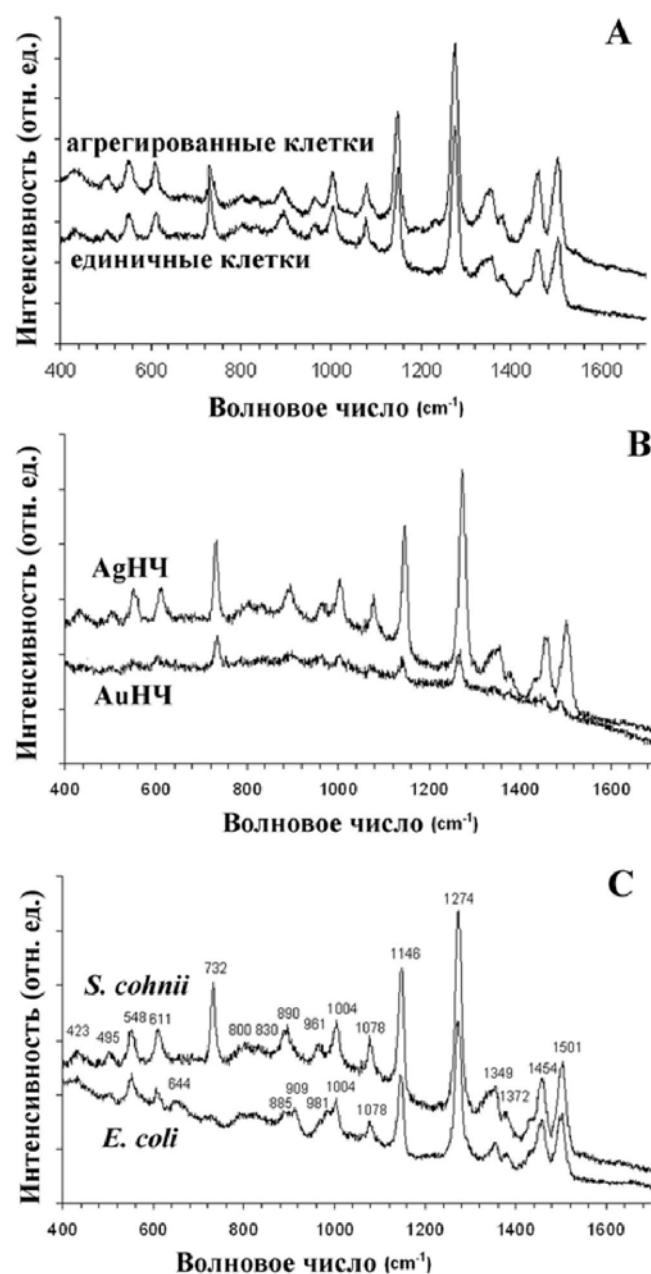


Рис. 20. SERS-спектры клеток (а) *S. cohnii*, модифицированных PАН/AgНЧ/PАН, полученных при исследовании агрегатов и единичных клеток; (б) *S. cohnii*, модифицированных PАН/AgНЧ/PАН и PАН/AuНЧ/PАН; (с) *S. cohnii* и *E. coli*, модифицированных PАН/AgНЧ/PАН.

молекул флавинадениндинуклеотида, N-ацетил-N-глюкозоамина и N-ацетилмурамовой кислоты (Zeiri et al, 2004; Jarvis et al, 2004). Флавинадениндинуклеотид локализуется, в основном, во внутренней цитоплазматической мембране бактерий (Efrima, Zeiri, 2009). Вероятно, наблюдаемый интенсивный пик при 730 см^{-1} на SERS-спектрах *E. coli* обусловлен проникновением наночастиц в цитоплазму. При применении послойной модификации клеточной стенки бактерий *E. coli* пленками РАН и серебряными наночастицами пик при 730 см^{-1} имел крайне низкую интенсивность. Обработка клеток поликатионом РАН увеличивает стабильность внешней мембраны клеток и препятствует проникновению наночастиц в цитоплазму. По данным литературы, SERS-спектры, полученные при неопосредованном смешивании бактерий и серебряных наночастиц, дают представление о биохимическом составе большого количества клеток, формирующих агрегаты, при этом не исключена возможность возникновения помех от спектров иных видов микроорганизмов, присутствующих в агрегатах (Jarvis, Goodacre, 2004; Jarvis et al, 2008). Получение спектральной информации от единичных клеток при неопосредованном смешивании крайне затруднено (Jarvis et al, 2004). Основным преимуществом разработанного метода модификации поверхности клеток бактерий полимерными пленками и наночастицами является слабая агрегация клеток, что позволяет характеризовать изолированные клетки.

3.2. Электрохимический биосенсор на основе клеток дрожжей, функционализированных полиэлектролитными пленками и многостенными углеродными нанотрубками

Углеродные нанотрубки являются эффективными усилителями, применяемыми в электрохимических биосенсорах (Zhao et al., 2006). Углеродные нанотрубки обычно наносят на поверхность электродов, на которые затем наносят рецепторный слой (ферменты, ДНК, микробные клетки и т.п.) (Zhang et al, 2007). В данной работе углеродные нанотрубки были закреплены на поверхности живых микробных клеток, иммобилизованных на электродах. Таким образом, вся поверхность клетки становится покрытой множеством наноэлектродов, связанных с макроэлектродом. Функционализированные дрожжи включали в полимерные пленки на поверхности стеклоуглеродных электродов (Рис. 21). Об активности иммобилизованных клеток судили по величине тока восстановления феррицианид-иона и по соотношению пиков на вольтамперограммах, характерных для квазиобратимого переноса электрона. Наблюдается смещение величины стандартного редокс-потенциала, определяемого как полусумма потенциалов пика окисления и восстановления, в направлении несколько меньших анодных значений ($E_0 = +200\text{ мВ}$ относительно Ag/AgCl) по сравнению со значением, полученным с использованием немодифицированного электрода. Это связано с ограничением скорости переноса электрона через слои многослойной полиэлектролитной пленки (РАН/РSS)₄. Установлено, что линейная зависимость тока в координатах $I - \sqrt{v}$ (I - ток пика восстановления феррицианида, мкА, v - скорость сканирования потенциала, мВ/с) характерна для диффузионного контроля переноса электрона (то есть замедленной стадии переноса $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$).

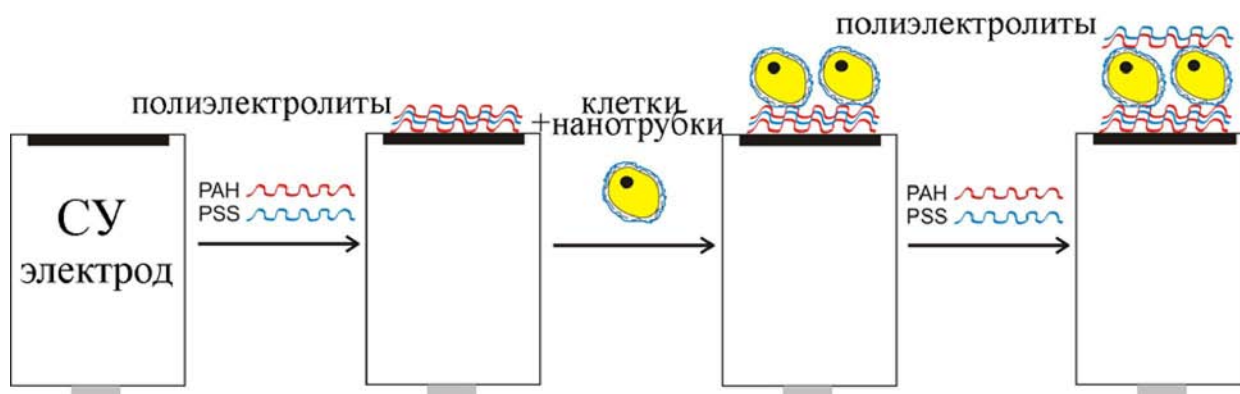


Рис. 21. Схема иммобилизации дрожжей (функционализированных при помощи полиэлектrolитов и углеродных нанотрубок) на поверхности стеклогуглеродного (СУ) электрода.

После включения слоя живых немодифицированных клеток дрожжей в многослойную полимерную пленку значение тока восстановления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ значительно сократилось, что объясняется участием $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ в переносе электрона в электрон-транспортной цепи живых дрожжей. При использовании мертвых клеток регистрируемое значение тока не только не снижалось, но даже незначительно возросло. Изменение величины тока пика восстановления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ при иммобилизации живых клеток составило $2,2 \pm 0,1$ мкА, что составляет около 20% от первоначальной величины тока в отсутствие клеток. Полученные вольтамперограммы $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ на электродах, модифицированных иммобилизованными клетками (функционализированными PAH/PSS/MWNT/PAH/PSS) и электродах, покрытых только пленкой (PAH/PSS)₄, практически совпадали.

Величина тока восстановления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ при внесении в поверхностный слой живых дрожжей, модифицированных PAH/PSS/MWNT/PAH/PSS, уменьшалась и составила $9,0 \pm 0,2$ мкА, тогда как при использовании мертвых дрожжей, модифицированных PAH/PSS/MWNT/PAH/PSS, это значение составило $12,0 \pm 0,1$ мкА. Изменение тока в экспериментах с живыми и мертвыми клетками, модифицированными многослойными полиэлектrolитными пленками и многостенными углеродными нанотрубками, значительно превышало таковое у интактных живых и мертвых клеток, говоря об усилении сигнала.

Дополнительным параметром, позволяющим определить разницу в электрохимическом поведении наномодифицированных живых и мертвых клеток, стало использование отмывки электродов после измерения и проведение повторных измерений (**Рис. 22**). Токи, отнесенные к восстановлению $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, снижались практически до нуля после 10 мин, что говорит о стремительном высвобождении феррицианид-ионов из поверхностного слоя. При использовании электродов, на поверхности которых были иммобилизованы функционализированные клетки, фиксировали увеличение тока восстановления на 15% от первоначального значения. В динамике, величина аналитического отклика в течение 3 минут отмывки достигала 50% от начального значения. Такое изменение величины тока является достаточным для распознавания живых и мертвых клеток.

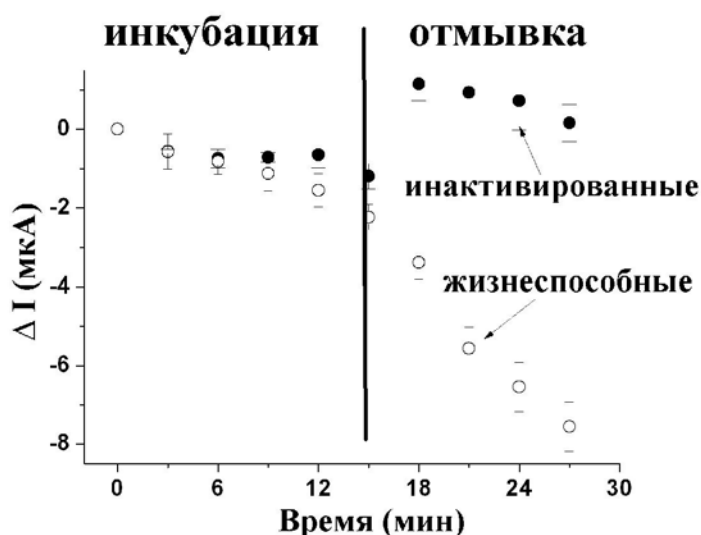


Рис. 22. Зависимость тока восстановления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ от жизнеспособности дрожжей, модифицированных PAA/PSS/MWNT/PAA/PSS.

Эффективность переноса электрона на $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, определяемая как падение тока пика восстановления (по сравнению с электродом, модифицированным слоем $(\text{PAA/PSS})_4$), существенно увеличивалась при использовании функционализированных клеток. Вероятно, это обусловлено частичным взаимным электростатическим отталкиванием отрицательно заряженных редокс-анионов и отрицательно же заряженных многостенных углеродных нанотрубок.

Биосенсор позволяет определять инактивацию или гибель клеток, вызванную токсичным веществом, находящимся в исследуемой жидкости. Функционализация клеток при помощи полимерных пленок и углеродных нанотрубок позволяет значительно усилить сигнал, обусловленный участием $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ в процессе переноса электрона в электрон-транспортной цепи клеток дрожжей. В качестве сенсорного элемента могут быть использованы любые микроорганизмы, что делает данный метод универсальным для создания респираторных микробных сенсоров или в противомикробных тестах для селективного определения антимикробной активности лекарственных препаратов или оценки показателей жизнеспособности клеток.

2.3. Магнитно-модифицированные клетки как компоненты биосенсоров для определения токсических веществ

Разработка эффективных подходов к иммобилизации микроорганизмов на поверхности физического преобразователя при конструировании микробных биосенсоров остается одной из нерешенных проблем. Существующие ныне способы закрепления клеток на рабочих поверхностях биосенсоров основаны на ковалентной кросс-сшивке клеток или на их включении в полимерную матрицу. Существенными недостатками данных способов является: 1) химическое воздействие на клетки, часто приводящее к их гибели и 2) необратимая иммобилизация клеток, делающая невозможным замену биорецепторного слоя. Дистанционное удерживание функционализированных микроорганизмов на рабочей поверхности биосенсора при помощи магнитного поля может стать перспективным решением. Ранее была описана магнитная модификация клеток при помощи наночастиц, приводившая к их гибели, что делало невозможным применение магнитно-модифицированных клеток в биоанализе (Safarik et al., 2007). Метод прямой модификации клеток при помощи PAA-стабилизированных магнитных частиц обеспечивает сохранение жизнеспособности клеток, что

позволяет использовать их для функционализации клеток и впоследствии в биосенсорах и биоаналитических микрочипах.

Схематическое изображение биоаналитического микрофлюидного чипа, основанного на магнитном удерживании клеток, представлено на **Рис. 23**. Микрокамеры чипа предназначены для удерживания магнитно-функционализированных клеток при помощи постоянного магнита. Клетки могут быть иммобилизованы в ячейках, а после анализа удалены в процессе отмытки. Аналитическим сигналом служит интенсивность уEGFP-опосредованной флуоресценции, пропорциональная концентрации генотоксичного вещества в среде. Установлено, что наночастицы не оказывают влияния на индукцию уEGFP в клетках. Дрожжи GreenScreen™ были функционализированы с использованием ряда концентраций магнитных наночастиц, после чего магнитно-модифицированные клетки помещали в лунки микропланшета и инкубировали в присутствии генотоксичного метилметансульфоната (ММС).

Наряду с магнитно-модифицированными клетками использовали и intactные клетки, а также клетки, покрытые РАН. Отсутствие ингибирования индукции уEGFP в результате генотоксичного воздействия ММС показано на гистограмме удельной интенсивности флуоресценции (**Рис. 24**). Это связано с высокой биосовместимостью РАН-стабилизированных магнитных наночастиц, что согласуется и с данными других исследователей (Diaspro et al, 2002, Krol et al, 2005). Размеры микрочипа позволяют наблюдать одновременно за всеми микрокамерами при помощи инвертированного микроскопа.

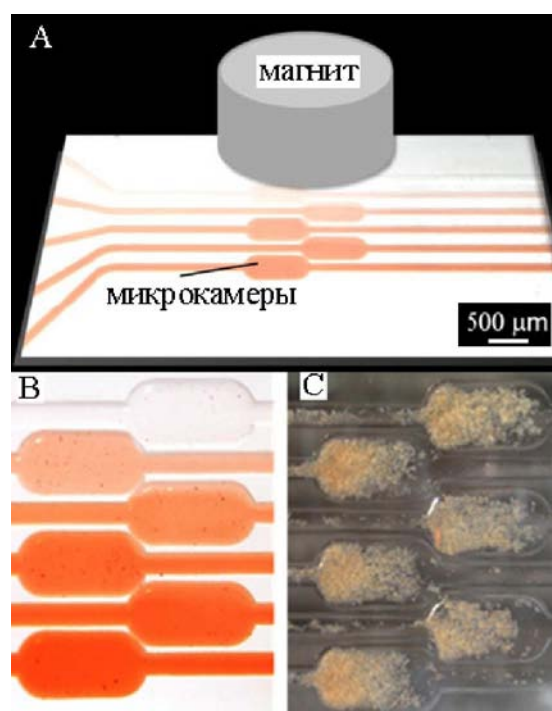


Рис. 23. Схематическое изображение магнитного биочипа (а); градиент концентраций (б) и магнитно-функционализированные дрожжи в микрокамерах, удерживаемые при помощи постоянного магнита (с).

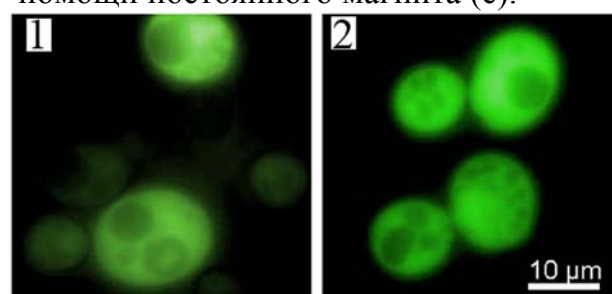


Рис. 24. Микрофотографии (1)- intactных и (2) - магнитно-модифицированных ГМ-дрожжей GreenScreen™ после индукции уEGFP с помощью ММС. (3) - гистограмма интенсивности флуоресценции.

На **Рис. 23, с** показана самосборка магнитно-модифицированных клеток в микрокамерах. Сила постоянного магнита и скорость потока жидкости позволяет удерживать клетки в микрокамерах в течение длительного времени (до 14 часов). При удалении постоянного магнита клетки немедленно вымываются из микрокамер с потоком жидкости, что позволяет с легкостью заменить клетки после проведения анализа. Аналитический отклик микрофлюидного чипа-анализатора генотоксичности на основе магнитно-модифицированных клеток GreenScreen™ определяли, пропуская через микрокамеры поток жидкости, содержащей градиент концентраций ММС (**Рис. 23, б**). Увеличение концентрации генотоксичного ММС в микрокамерах приводит к пропорциональному увеличению интенсивности флуоресценции магнитно-функционализированных клеток. Гистограмма удельной интенсивности флуоресценции (**Рис. 25**) демонстрирует увеличение аналитического сигнала с увеличением концентраций ММС (от 0 до 450 мкМ). Фоновая флуоресценция обусловлена нормальной активностью синтеза ферментов репарации, обуславливающего наличие небольших количеств уEGFP в клетках GreenScreen™. Таким образом, впервые показано применение магнитно-функционализированных клеток в качестве сенсорного элемента в микрофлюидных биоаналитических чипах.

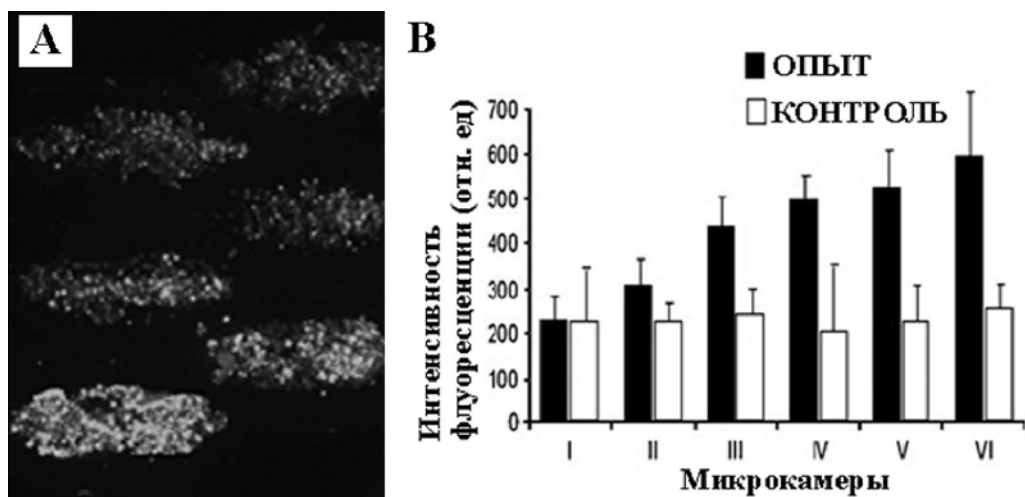


Рис. 25. (а) - ММС-индукция уEGFP-флуоресценции в магнитно-модифицированных дрожжах GreenScreen™ (интенсивность флуоресценции в клетках пропорциональна градиенту концентрации ММС в камерах). (б) – гистограмма интенсивности уEGFP-флуоресценции.

Магнитно-функционализированные клетки *C. pyrenoidosa* использовали в амперометрических биосенсорах на основе печатных электродов. Клетки закрепляли на поверхности электрода при помощи постоянного магнита. Для размещения магнита под печатным электродом была изготовлена фторопластовая подложка (**Рис. 26, а**) с цилиндрической выемкой для закрепления магнита (2 мм). Магнит обеспечивал присоединение клеток к поверхности рабочего электрода (**Рис. 26, б**) в течение длительного времени. Гербициды триазинового ряда вызывают гибель клеток водорослей в результате блокировки фотосистемы II, приводя к ингибированию переноса электрона на уровне фотохимического реакционного центра (Shitanda et al., 2005; Chong et al., 2008; Shitanda et al., 2009). Концентрация гербицидов может быть определена при помощи

амперометрических биосенсоров на основе иммобилизованных водорослей (Védrine et al., 2003). Блокировка переноса электрона в фотосистеме II растений гербицидами приводит к релаксации системы в процессе эмиссии фотона в виде автофлуоресценции (Giardi et al., 2001).

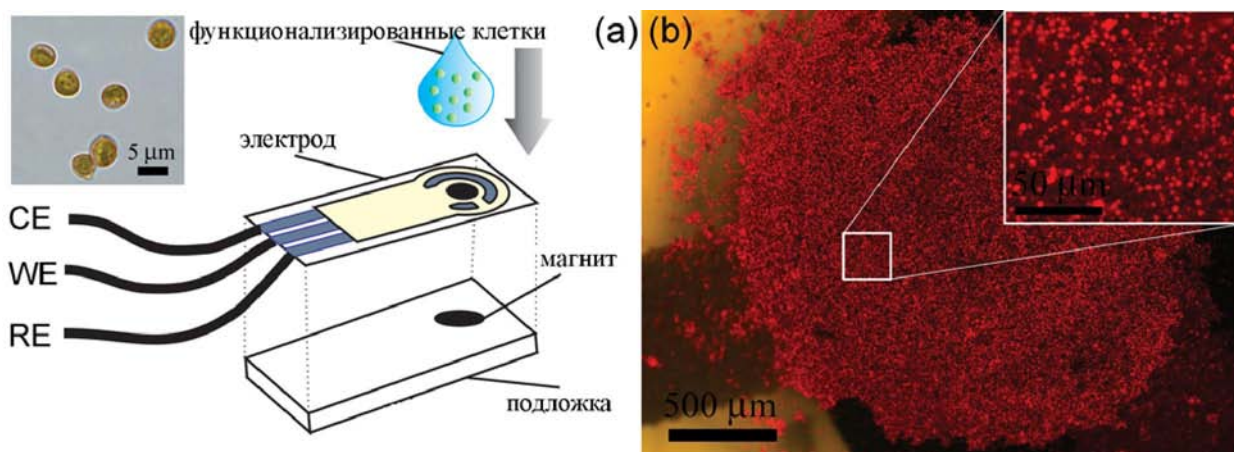


Рис. 26. (a) – схематическое изображение амперометрического биосенсора, основанного на магнитно-модифицированных клетках *C. pyrenoidosa*, удерживаемых на поверхности печатного электрода при помощи постоянного магнита; (b) – эпифлуоресцентная микрофотография магнитно-модифицированных клеток *C. pyrenoidosa* на поверхности печатного электрода (при меньшем и большем увеличении).

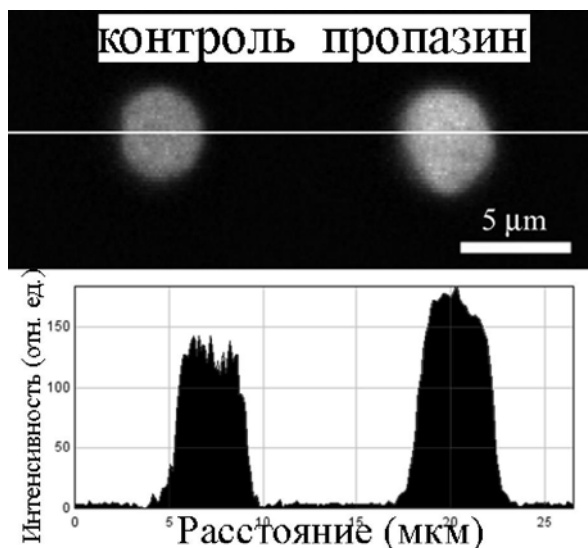


Рис. 27. Индукция флуоресценции под воздействием пропазина (гербицида триазинового ряда) в магнитно-модифицированных клетках *C. pyrenoidosa*. Верхний ряд – типичные флуоресцентные микрофотографии клетки до (слева) и после (справа) воздействия пропазина. Нижний ряд – денситограммы интенсивности флуоресценции.

Интенсивность автофлуоресценции хлорофилла В в интактных клетках усиливается при контакте клеток с триазиновыми гербицидами. Установлено, что магнитно-модифицированные водоросли сохраняют способность к индукции автофлуоресценции под влиянием триазиновых гербицидов (**Рис. 27**). Магнитно-модифицированные клетки *C. pyrenoidosa* инкубировали в присутствии пропазина (1.14×10^{-5} М) в течение 1 часа (25 °С), после чего были получены микрофотографии клеток. Для определения интенсивности фоновой автофлуоресценции в качестве контроля использовали интактные магнитно-модифицированные клетки *C. pyrenoidosa*. Установлено, что пропазин вызывает индукцию флуоресценции в клетках водорослей, значения интенсивности флуоресценции составили 98 ± 11 о.е. (контроль) и 151 ± 13 о.е. (опыт).

Аналогичные результаты получены с использованием атразина. Результаты свидетельствуют о том, что слой магнитных наночастиц на поверхности клеток не препятствует проникновению триазиновых гербицидов внутрь клетки.

Содержание гербицидов при помощи биосенсора определяли с использованием водных растворов гербицидов триазинового ряда. Аликвоты магнитно-модифицированных клеток помещали в растворы, содержащие $K_3Fe(CN)_6$ и Na_2SO_4 , после чего клетки наносили на электрод. Клетки самоорганизуются вокруг постоянного магнита (**Рис. 26, б**). Амперометрические измерения проводили при -600 мВ.

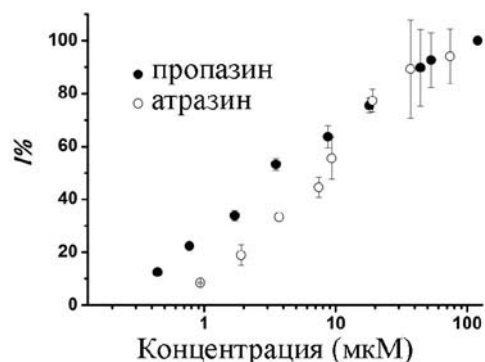


Рис. 28. Зависимость изменения тока от концентрации гербицидов (атразина и пропазина).

Удаление помех, связанных с фоновым током, позволяет исключить влияние неравномерного распределения молекул гербицидов в жидкости. Использование мертвых магнитно-модифицированных клеток обуславливало сигнал, составляющий 2-3% от величины сигнала, полученного с использованием живых клеток. Зависимость величины аналитического отклика биосенсора от концентрации гербицидов (атразина и пропазина) показана на **Рис. 28**. Линейная зависимость аналитического отклика биосенсора от концентрации гербицидов триазинового ряда наблюдается в области концентраций от 0,6 до 120 мкМ для пропазина и от 0,9 до 74 мкМ для атразина. Предел обнаружения гербицидов составил 0,4 мкМ для пропазина и 0,7 мкМ для атразина.

2.5. Магнитно-модифицированные бактериальные биорепортерные клетки (клетки-биосенсоры)

Бактериальные биорепортеры *A. baylyi* (ADPWH_lux, ADPWH-Pu-lux-xylR и ADPWH_Alk) в ответ на присутствие в среде токсина аккумулируют люминесцентный белок люциферазу, обуславливающую интенсивную биолюминесценцию клеток (Huang et al., 2006). Для получения информации о содержании индуктора в среде биорепортеры *A. baylyi* использовали *per se*, без каких-либо трансдюсеров. Количественную оценку интенсивности биолюминесценции проводили при помощи планшетных люминометров. Магнитная модификация клеток *A. baylyi* была направлена на выделение и концентрирование клеток после их инкубации в среде (водные растворы токсинов, суспензии почв или песка). Штамм ADPWH_lux является биорепортером, реагирующим на присутствие в среде салициловой кислоты. Для индукции биолюминесценции, индуктору необходимо преодолеть цитоплазматическую мембрану, при этом в цитоплазме происходит взаимодействие индуктора с регуляторным белком SalR, который, после изменения конформации, вызванной воздействием салициловой кислоты, активирует соответствующий промотор, вызывающий экспрессию гена *luxCDABE*, обуславливающего синтез люциферазы и, соответственно, биолюминесценцию.

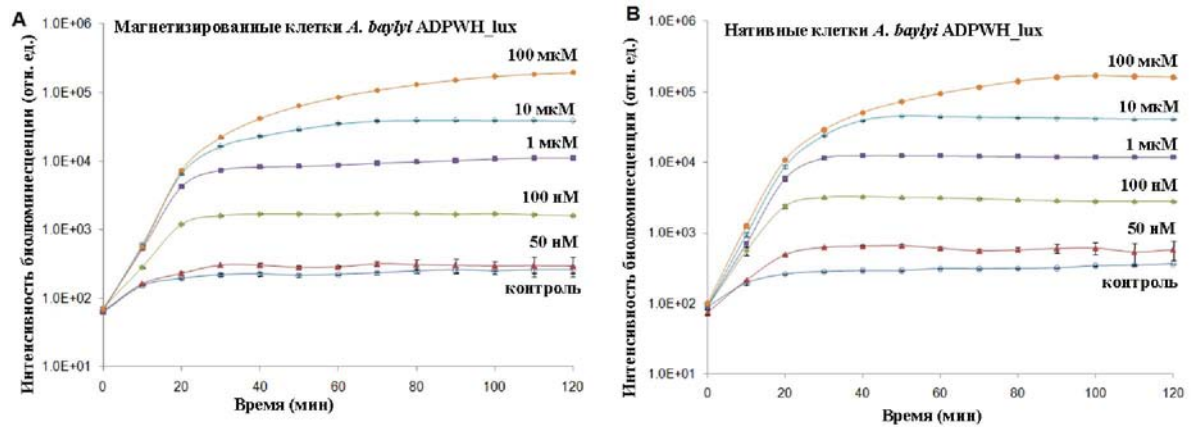


Рис. 29. Индукция биорепортерного сигнала салициловой кислотой у (а) - магнитно-модифицированных и (б) – intactных клеток *A. baylyi* ADPWH_lux.

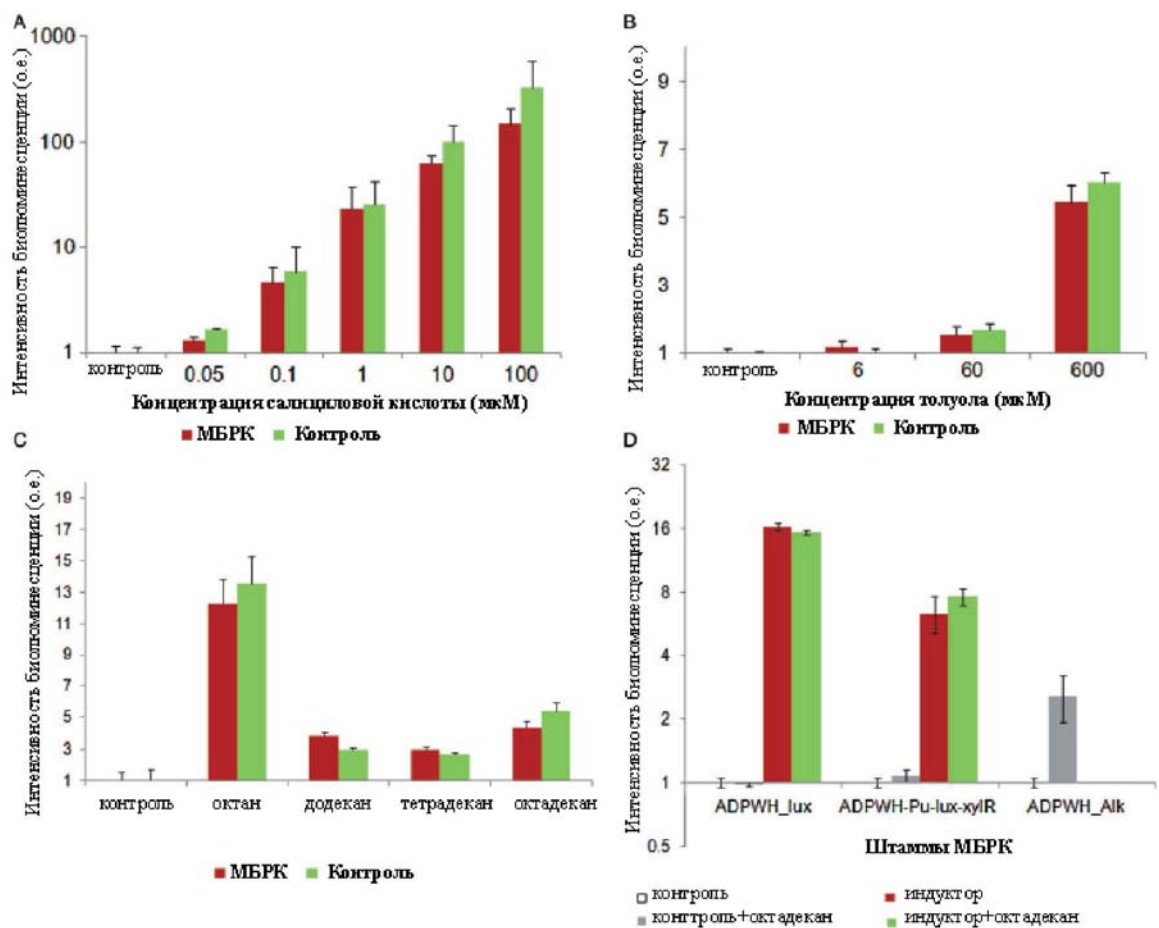


Рис. 30. Биорепортерная активность магнитно-модифицированных и intactных клеток *A. baylyi*. Аналитический отклик магнитно-модифицированных и intactных (а) – клеток *A. baylyi* ADPWH_lux, обусловленный воздействием салициловой кислоты в концентрациях от 50 нМ до 100 мМ; (б) - клеток *A. baylyi* ADPWH-Pu-lux-xylR, обусловленный воздействием толуола в концентрациях от 6 до 600 мМ; (с) - клеток *A. baylyi* ADPWH_Alk, обусловленный воздействием октана, додекана, тетрадекана и октадекана; (д) – специфичность биорепортерной активности магнитно-модифицированных и intactных клеток *A. baylyi* (ADPWH_lux, ADPWH-Pu-lux-xylR и ADPWH_Alk) в насыщенном октадекане, 1 мМ салициловой кислоте и 300 мМ толуола (в присутствии или отсутствии насыщенного октадекана).

Относительную биолюминесценцию определяли в динамике как отношение абсолютной люминесценции к числу клеток. В качестве контроля использовали intactные клетки *A. baylyi* ADPWH_lux. Наблюдается одинаковая зависимость динамического изменения относительной биолюминесценции и максимальной величины аналитического отклика в образцах intactных и магнитно-модифицированных клеток (Рис. 29), что свидетельствует о проникновении салициловой кислоты в клетки и о ненарушенном процессе индукции синтеза люциферазы (предел обнаружения для салициловой кислоты - 50 нМ). Несколько сниженные значения отклика в образцах магнитно-модифицированных биорепоптеров связаны, вероятно, с оптическим эффектом наночастиц. Изучена индукция биолюминесценции в штаммах ADPWH-Pu-lux-xylR и ADPWH_Alk, предназначенных для определения толуола и алканов, соответственно. Гидрофобные вещества проникали в цитоплазму магнитно-модифицированных клеток, интенсивность биолюминесценции практически не отличалась от таковой в intactных клетках. Установлено, что включение октадекана в исследуемую смесь не приводило к индукции биолюминесценции ADPWH-Pu-lux-xylR и ADPWH_lux, однако индукция биолюминесценции имела место при использовании клеток штамма ADPWH_Alk (Рис. 30). При анализе образцов почвы и речного песка в среду была внесена салициловая кислота. Суспензии почвы и песка были смешаны с аликвотами магнитно-модифицированных клеток *A. baylyi* ADPWH_lux, после инкубации клетки отделяли при помощи постоянного магнита, ресуспендировали и помещали в лунки микропланшета. Наблюдается зависимость относительной биолюминесценции от концентрации салициловой кислоты в речном песке и почве (Рис. 31).

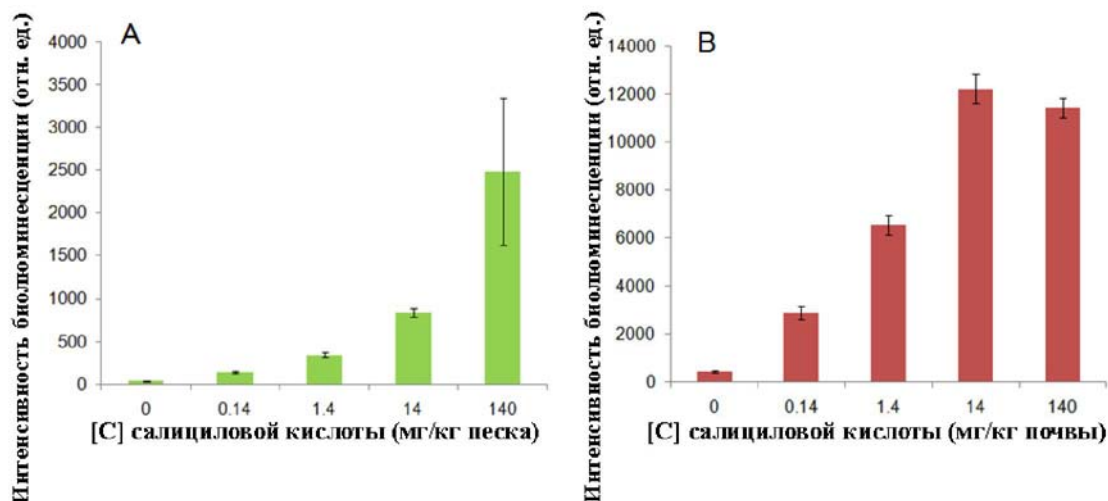


Рис. 31. Интенсивность биолюминесценции при определении салициловой кислоты с помощью магнитно-модифицированных клеток-биорепоптеров *A. baylyi* ADPWH_lux в суспензиях речного песка (а) и почвы (б) через 90 мин инкубации после магнитного выделения клеток.

Различия в сенсорном отклике образцов песка и почвы связаны с многокомпонентным характером исследуемых образцов, не исключающими ингибирования или усиления проникновения салициловой кислоты в клетку. В образцах почвы, содержащих высокие концентрации салициловой кислоты (14 мг/мл и 140 мг/мл), могло произойти насыщение клеток салицилатом, что дает предельные значения биолюминесценции.

4. Искусственные многоклеточные системы (цитозомы) на основе функционализированных микроорганизмов

В работе были впервые получены трехмерные упорядоченные структуры из живых клеток микроорганизмов, получившие название «цитозомы» (по аналогии с коллойдосомами (Velev, Nagayama, 1997)).

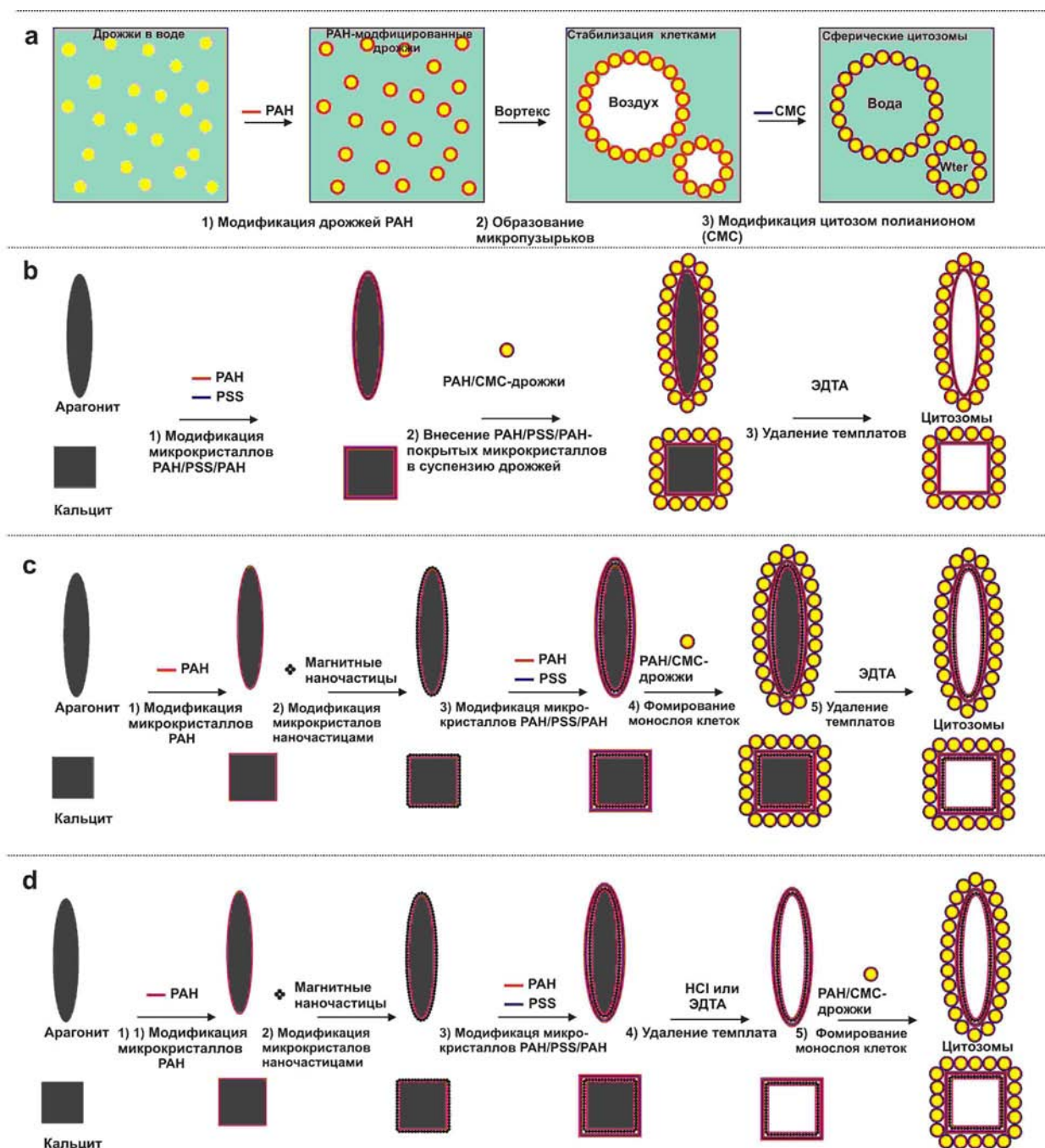


Рис. 32. Схематическое изображение путей получения цитозом из клеток дрожжей, с использованием в качестве шаблонов: (а) – микропузырьков воздуха; (б) – микрокристаллов арагонита и кальцита (без предварительной магнитной модификации микрокристаллов); (в) – микрокристаллов арагонита и кальцита (с предварительной магнитной модификацией микрокристаллов); (г) – изначально полых микрокапсул, полученных с использованием магнитно-модифицированных микрокристаллов арагонита и кальцита.

В цитозомах клетки иммобилизованы в полиэлектролитной матрице, предварительно сформированной на поверхности темплата. После удаления темплатов были получены полые трехмерные капсулы, обладающие внешней оболочкой (повторяющей трехмерную форму темплата), состоящей из монослоя живых клеток, включенных в многослойную полимерную пленку. Схематическое изображение путей создания цитозом показано на **Рис. 32**. Использовали дрожжи, функционализированные многослойными полиэлектролитными пленками РАН и СМС. В качестве темплатов использовали: 1) микропузырьки воздуха; 2) микрокристаллы арагонита и кальцита, немодифицированные и 3) предварительно модифицированные при помощи ТМА-стабилизированных магнитных наночастиц; 4) полые магнитно-модифицированные микрокапсулы. Были получены изотропные (сферические, кубические) и анизотропные (игловидные, прямоугольные) цитозомы.

4.1. Сферические цитозомы на основе микропузырьков воздуха

Стабилизация эмульсий и пен при помощи твердых коллоидных частиц длительное время используется на практике (Shchukin et al., 2005; Winterhalter, Sonnen, 2006). Клетки микроорганизмов также способны к стабилизации эмульсий, однако в стабилизации пузырьков газа, диспергированного в жидкости, клетки ранее не применялись, что обусловлено одноименным отрицательным поверхностным зарядом клеток и микропузырьков воздуха в воде (Marinova et al., 1996, Yang et al., 2001). Использование микропузырьков воздуха в воде в качестве темплата для самосборки клеток приводит к исключительно простой системе, которая могла иметь место в естественных условиях. Поверхностный заряд клеток инвертируется после их модификации пленкой РАН/СМС/РАН (ζ -потенциал: + 20 мВ). Клетки, несущие положительный заряд, эффективно стабилизируют микропузырьки воздуха в воде. Для получения сферических цитозом отбирали верхнюю часть суспензии, содержащую стабилизированные клетками микропузырьки воздуха, а свободные клетки оседали на дно сосуда. Воздух самопроизвольно диффундировал из микропузырьков, в результате клетки формировали полую сферическую структуру, воспроизводящую по форме и размерам исходный микропузырек (**Рис. 33**).

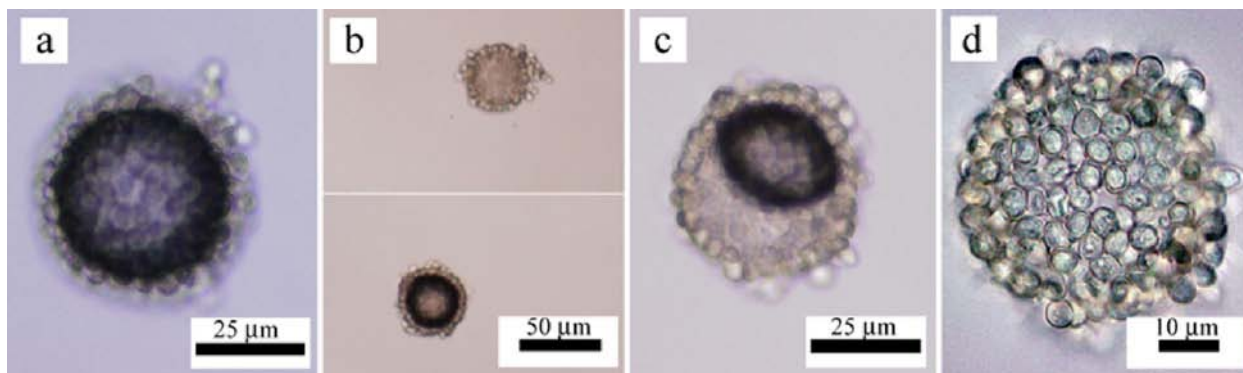


Рис. 33. Процесс самосборки цитозом. (а) – микропузырек воздуха, стабилизированный монослоем клеток дрожжей; (б) – микропузырьки сосуществуют с цитозомами; (с) – воздух постепенно диффундирует из микропузырьков, стабилизированных клетками, приводя к образованию (д) полых цитозом (трехмерная оптическая реконструкция).

После удаления воздуха, цитозомы покрывали трехслойной пленкой СМС/РАН/СМС для фиксации клеток в полиэлектролитной мембране. Цитозомы обладали высокой механической стабильностью, например, они не были разрушены при высушивании и помещении в вакуум при СЭМ. СЭМ-микрофотографии (**Рис. 34**) демонстрируют распределение размеров цитозом (20 до 200 мкм), что определяется диаметром клеток (5-7 мкм) и максимальным стабильным диаметром микропузырьков. Размеры дегидратированных цитозом в среднем на 30% меньше аналогичных размеров нативных цитозом, определенных с использованием оптической микроскопии, что связано с усыханием клеток дрожжей при подготовке образца для СЭМ.

4.2. Анизотропные цитозомы на основе микрокристаллов карбоната кальция

Для получения анизотропных цитозом в качестве темплатов использовали микрочастицы карбоната кальция. Для арагонита характерна игловидная или веретеновидная форма (с некоторой примесью пластинчатых микрокристаллов), а для кальцита – кубическая форма. Химическая декомпозиция карбоната кальция осуществляется в кислой среде либо с помощью хелатирующих реагентов.

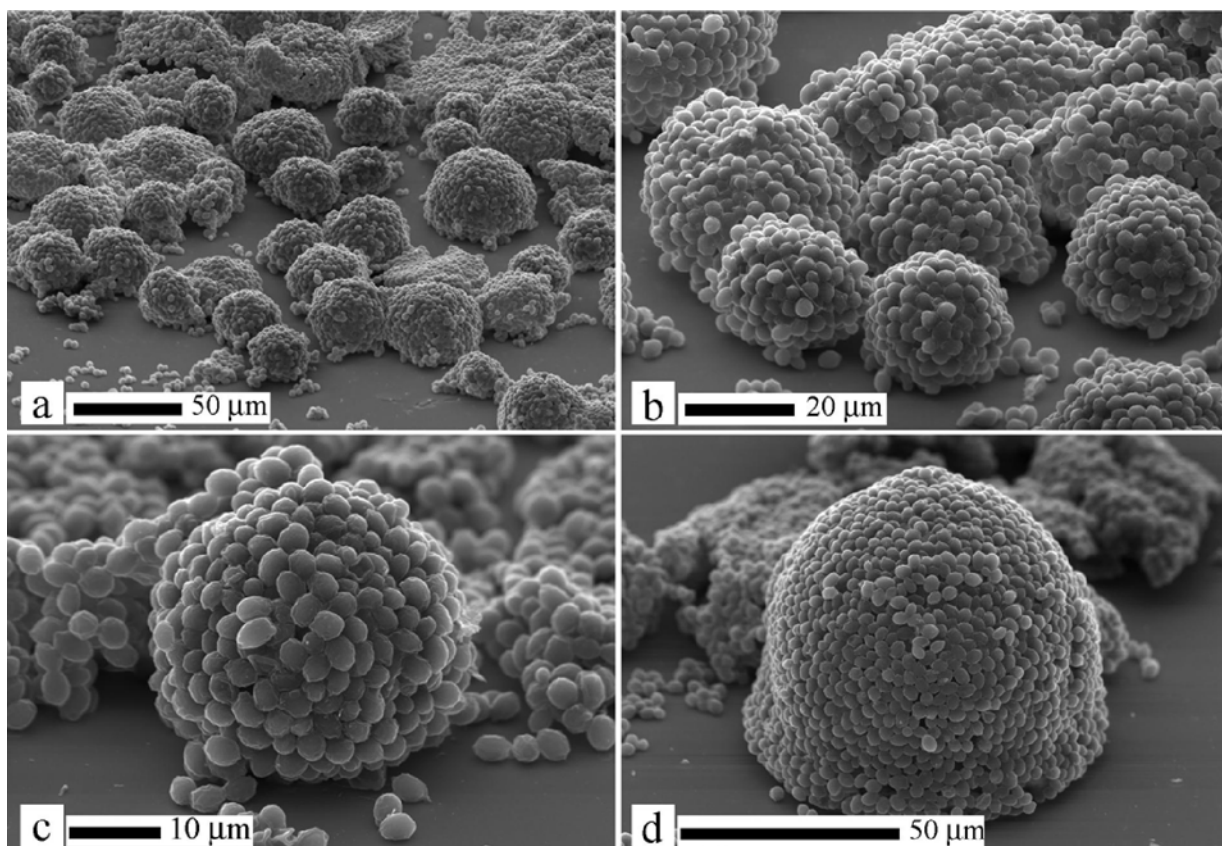


Рис. 34. СЭМ-микрофотографии сферических цитозом, помещенных на стеклянные подложки.

Микрокристаллы модифицировали полиэлектролитами (РАН/PSS/РАН) для последующего присоединения к ним отрицательно заряженных дрожжей. Дрожжи, функционализированные пленкой РАН/СМС, и микрокристаллы

смешивали, инкубировали и отделяли от свободных клеток в процессе многократной элиминации супернатанта от осадка.

Обработав полученные микроструктуры дополнительными слоями РАН/СМС, получали многоклеточные системы, состоящие из микрокристаллов арагонита и кальцита, покрытых монослоем клеток дрожжей (**Рис. 35**). Монослой клеток эффективнее формируется на поверхности кальцита, что объясняется большей площадью граней микрокубиков. Присутствие свободных клеток обусловлено недостаточной эффективностью разделения микрокристаллов, покрытых клетками, от суспензии свободных клеток. Для получения полых цитозом микрокристаллы удаляли при помощи ЭДТА.

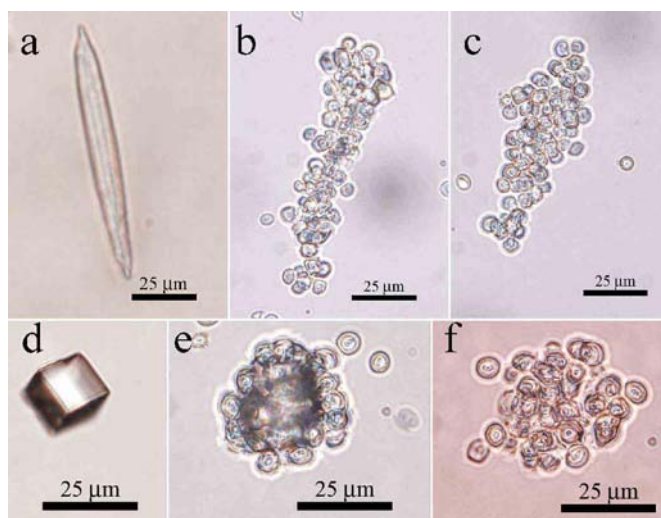


Рис. 35. Оптические микрофотографии микрокристаллов (а) - арагонита и (d) - кальцита; (b) и (e) - микрокристаллов, покрытых полиэлектролитами и клетками; (c) и (f) – анизотропных цитозом на их основе.

Геометрическая форма цитозом воспроизводит форму использованных микрокристаллов. Состав полимерных пленок был подобран нами таким образом, что последним полиэлектролитным слоем всегда служил отрицательно заряженный полиион (PSS или СМС), что позволяло предотвратить электростатическое прилипание клеток, микрокристаллов и цитозом к пластиковым стенкам микропробирок.

4.3. Анизотропные цитозомы на основе магнитно-модифицированных микрокристаллов карбоната кальция

Использование магнитных наночастиц для разделения компонентов в сложной смеси является перспективным подходом для отделения цитозом от свободных клеток. Для магнитной модификации микрокристаллы покрывали полиэлектролитами, а затем магнитными наночастицами. Магнитные отрицательно заряженные ТМА-стабилизированные наночастицы наносили на РАН-модифицированные микрокристаллы, после чего их окраска становилась буро-коричневой (**Рис. 36**). Полимерная пленка на поверхности микрокристаллов, допированная наночастицами, состояла из РАН/МНЧ/РАН/PSS/РАН/PSS/РАН. В ряде экспериментов использовали магнитно-восприимчивые микрокристаллы кальцита, содержащие магнитные наночастицы внутри микрокристалла. Магнитная модификация микрокристаллов позволяет использовать внешнее магнитное поле для отделения микрокристаллов от раствора. Ориентация магнитно-модифицированных микрокристаллов кальцита и арагонита вдоль линий магнитного поля является характерным признаком магнитно-

восприимчивых микрочастиц. При создании цитозом магнитно-модифицированные микрокристаллы вносили в суспензию дрожжей, покрытых РАН/СМС.

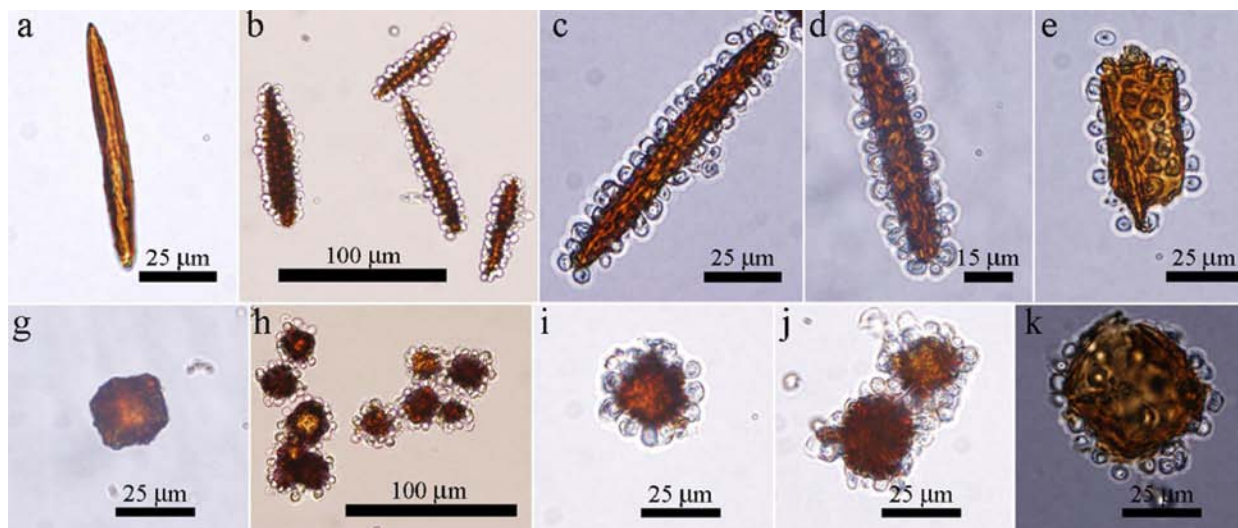


Рис. 36. Оптические микрофотографии (a) (g) - микрокристаллов арагонита и кальцита, модифицированных РАН/МНЧ; (b) и (h) – магнитных микрокристаллов, покрытых полиэлектролитами и клетками; (c-e) и (i-k) – магнитных анизотропных цитозом.

После инкубации микрокристаллы, покрытые клетками дрожжей, отделяли при помощи постоянного магнита и модифицировали дополнительно бислоем РАН/СМС. В результате, получены суспензии микрокристаллов, покрытых клетками дрожжей, не содержавшие свободных клеток. Клетки формируют монослой на поверхности микрокристаллов, в котором практически отсутствуют промежутки между клетками. Микрокристаллы любой геометрии (иглы, кубики и планарные частицы) покрыты клетками одинаково, что говорит об универсальности метода.

Магнитная функционализация позволила установить, что присутствие свободных клеток в образцах покрытых клетками микрокристаллов обусловлено не диссоциацией клеток с поверхности микрокристаллов, а несовершенной системой очистки образцов от свободных клеток. После удаления темплатов в ЭДТА получены, полые цитозомы, отделяемые от суспензии свободных клеток с помощью магнита. Обработка ЭДТА не приводит к отсоединению клеток с поверхности микрокристаллов. Цитозомы являются хрупкими конструкциями, существенное локальное изменение давления приводит к их разрушению.

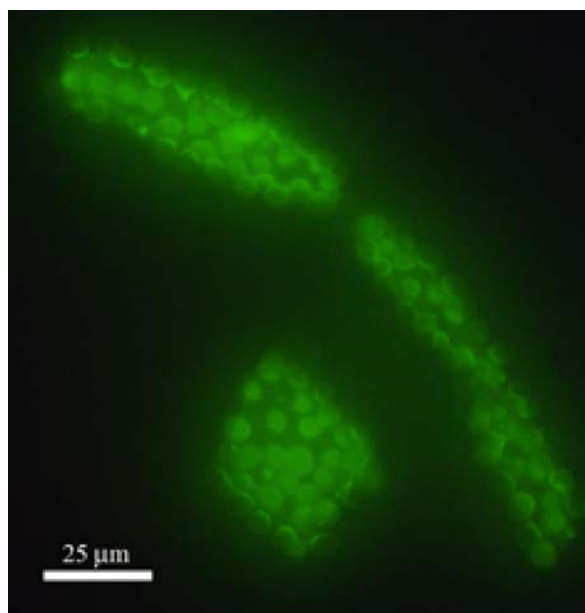


Рис. 37. Флуоресцентная микрофотография анизотропных цитозом.

Магнитное разделение позволяет избежать разрушения цитозом, имеющего место в случае центрифугирования образцов, или иного механического воздействия, тогда как неразрушающее воздействие магнитного поля дает возможность существенно повысить эффективность получения цитозом (на 78% в сравнении с использованием немодифицированных микрокристаллов). Наиболее эффективно самосборка клеток происходила на планарных микрокристаллах, имевших наибольшую ширину, что связано с минимальным стерическим отталкиванием одноименно заряженных клеток в таких системах. Упорядоченное расположение клеток на поверхности цитозом напоминает эпителиальный слой клеток, наблюдаемый на микроскопических препаратах простейших многоклеточных организмов. Микрофотография, представленная на **Рис. 37**, позволяет однозначно определить наличие клеток на фронтальных поверхностях цитозом.

4.4. Анизотропные цитозомы на основе полых микрокапсул, полученных с использованием магнитно-модифицированных микрокристаллов арагонита и кальцита

Разработана альтернативная техника получения цитозом, позволяющая исключить стадию химической декомпозиции микрокристалла. Микрокристаллы кальцита и арагонита были модифицированы путем последовательного нанесения полиэлектролитных пленок и ТМА-стабилизированных магнитных наночастиц (РАН/МНЧ/РАН/РСС/РАН), после чего их растворяли в HCl или ЭДТА. В результате получены полые микрокапсулы, форма которых воспроизводила форму исходных микрокристаллов (**Рис. 38**).

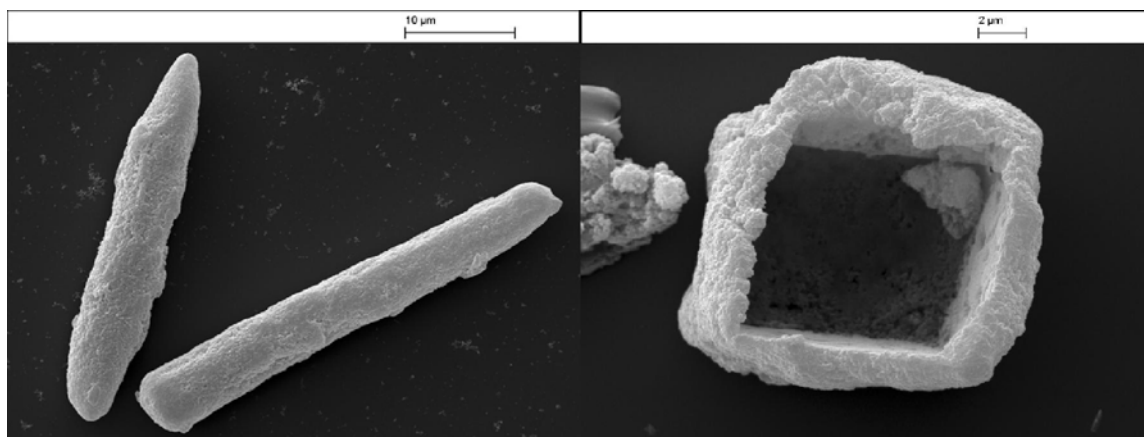


Рис. 38. СЭМ-микрофотографии полых магнитных микрокапсул.

Микрокапсулы выдерживают механическое воздействие (встряхивание, центрифугирование) и обладают магнитными свойствами, что позволяет отделять их от клеточной суспензии при помощи магнита, сокращая риск разрушения микрокапсул в процессе нанесения клеток. В основе стабильности полых магнитно-модифицированных микрокапсул лежит слой магнитных наночастиц, формирующих плотную оболочку. Микрокапсулы игловидной и кубической формы использовали для создания анизотропных магнитных цитозом. В результате электростатического взаимодействия клетки формировали монослой на поверхности микрокапсул. Отделение цитозом от суспензии свободных клеток осуществляли при помощи постоянного магнита. Микрофотографии цитозом

представлены на **Рис. 39**. Характерное расположение клеток на поверхности полых микрокапсул в виде монослоя хорошо просматривается как на игловидных, так и на пластинчатых композитных микрочастицах.

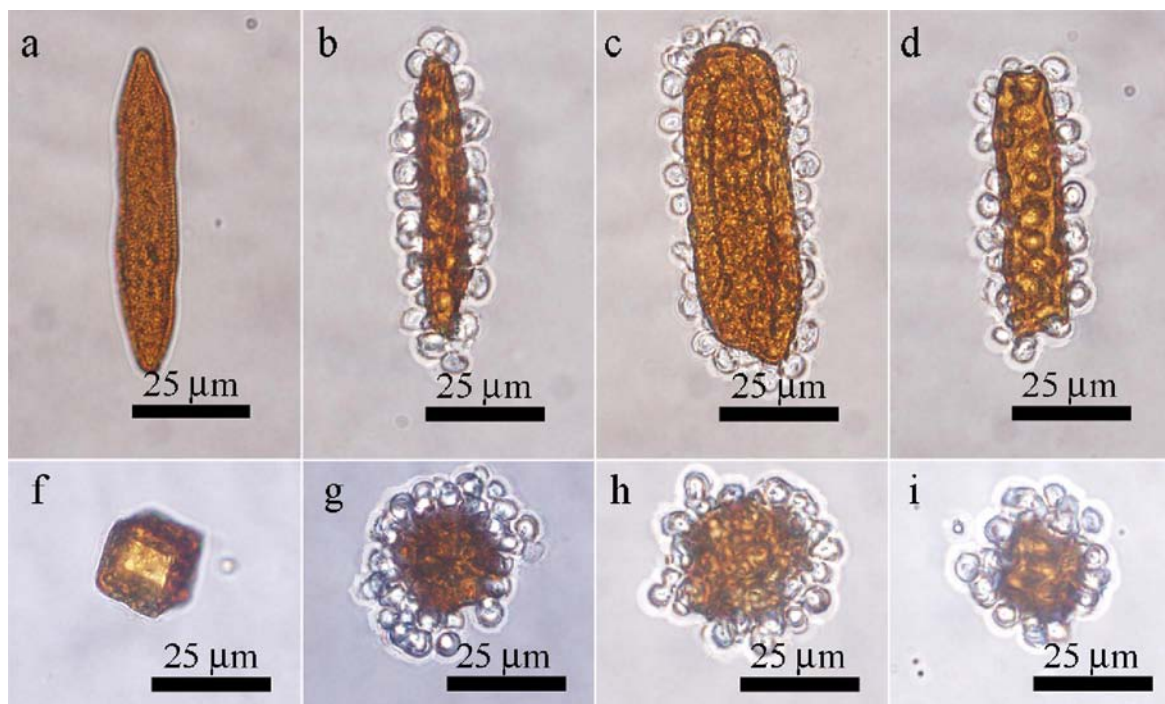


Рис. 39. Оптические микрофотографии полых микрокапсул (a,f) и магнитных цитозом, полученных с использованием игловидных (верхний ряд) и кубических (нижний ряд) микрокапсул.

Конфокальные изображения (**Рис. 40**) и СЭМ-микрофотографии (**Рис. 41**) игловидных и кубических цитозом иллюстрируют формирование монослоя клеток на поверхности полых микрокапсул. Сохранение жизнеспособности клеток было ожидаемым, ведь в процессе получения цитозом клетки, фактически, модифицируются исключительно бислойной пленкой РАН/СМС, которая не оказывает отрицательного влияния на жизнеспособность (**Рис.42**). Жизнеспособность клеток сохранялась до 4 недель при хранении цитозом при 4°C в стерильных условиях.

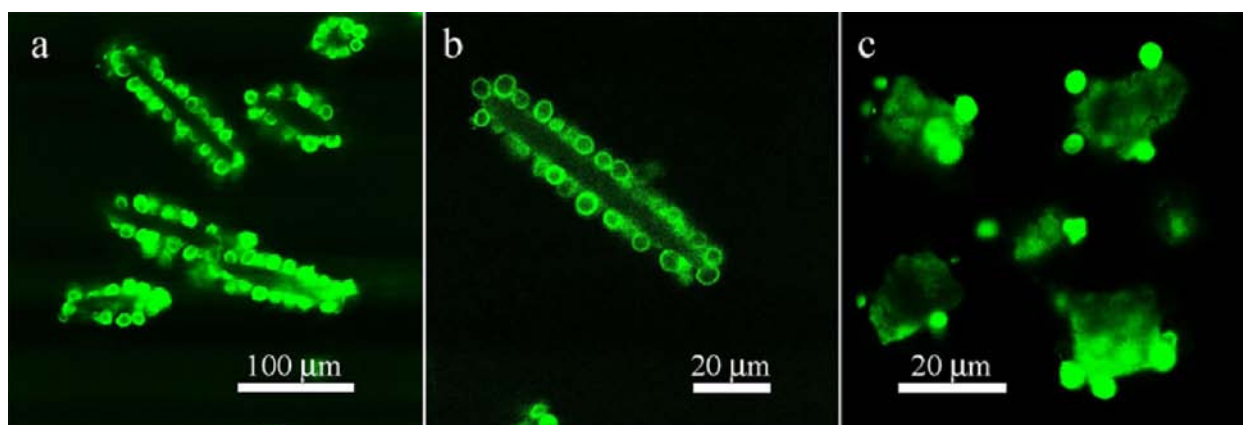


Рис. 40. Конфокальные изображения магнитных цитозом, полученных с использованием полых игловидных (a,b) и кубических (c) микрокапсул.

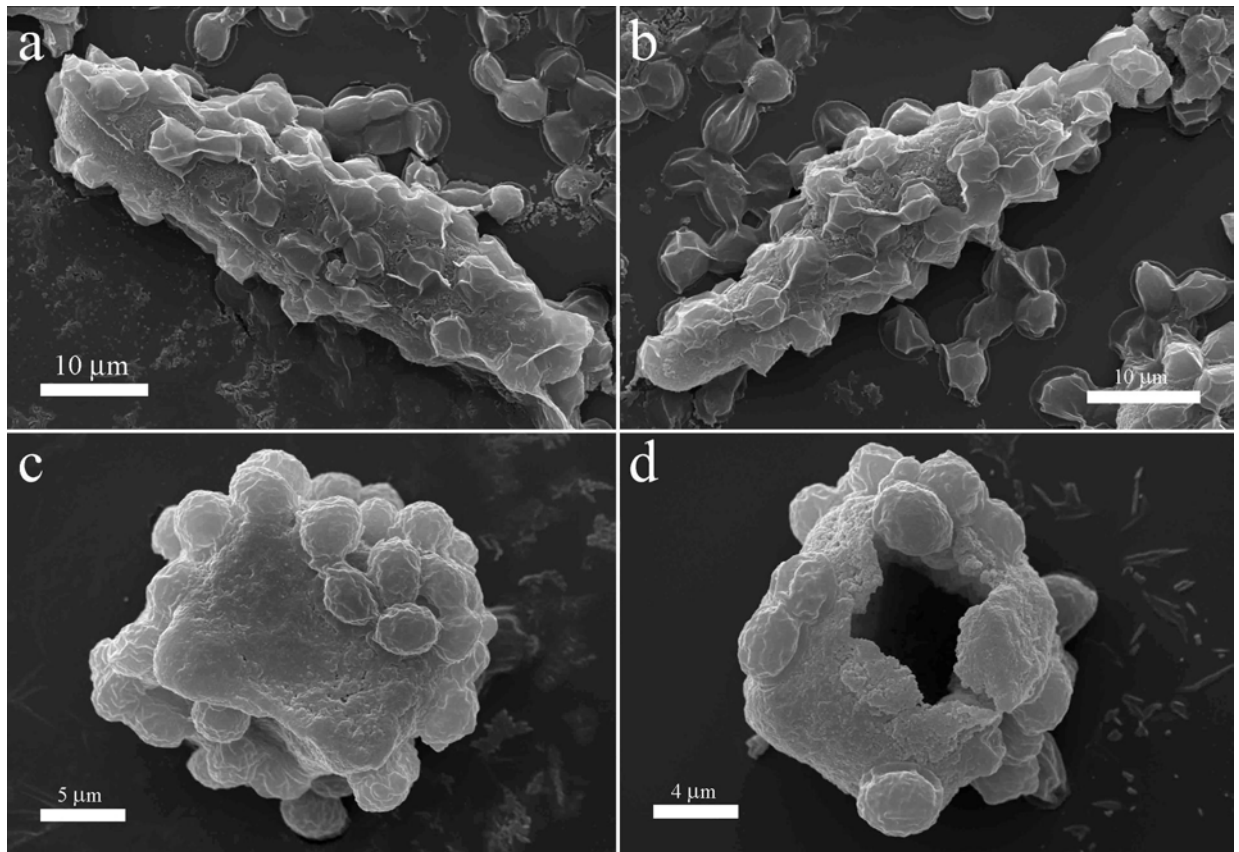


Рис. 41. СЭМ-микрофотографии магнитных цитозом, полученных с использованием полых игловидных (a,b) и кубических (c,d) микрокапсул.

Полученные *in vitro* искусственные трехмерные кластеры клеток имеют существенное внешнее сходство с некоторыми существующими в природе колониальными микроорганизмами (например, *Volvox spp*). Эволюционный процесс возникновения многоклеточных организмов из одноклеточных до сих пор неясен (King, 2004; Kirk, 2005). Считается, что процесс перехода от одноклеточных к многоклеточным организмам происходил многократно и независимо (Brooke, Holland, 2003).

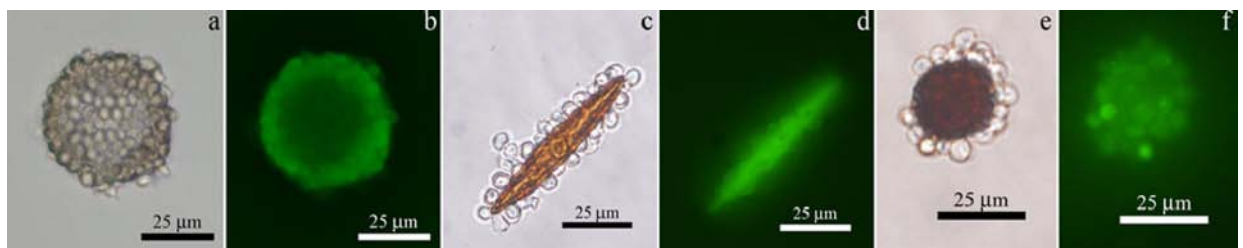


Рис. 42. Жизнеспособность цитозом: оптические и соответствующие им флуоресцентные микрофотографии цитозом после инкубации с ФДА.

Колониальная теория возникновения многоклеточности является одной из наиболее признанных (Desnitski, 1993; Michod et al., 2006), однако какие-либо ископаемые, позволяющие подтвердить или опровергнуть ее, отсутствуют. В данной работе были получены многоклеточные кластеры, состоящие из полимерной мембраны, содержащей клетки, и внешне представляющие собой полую сферическую, кубическую или игловидную трехмерную микроструктуру. Структура цитозом стабильна, клетки в их составе сохраняют свою

жизнеспособность в течение нескольких недель. Фактически, данные многоклеточные структуры являются крайне примитивной рукотворной моделью многоклеточного организма. В колониальных микроорганизмах и простейших многоклеточных организмах наблюдается такое же принципиальное строение – имеется полимерная мембрана (внеклеточная матрица), в которой заключены клетки. Безусловно, живые организмы устроены гораздо сложнее. Тем не менее, цитозомы также содержат искусственную внеклеточную матрицу (многослойная полимерная пленка), содержащую живые клетки, при этом трехмерная форма матрицы воспроизводит форму использованного темплата. Так как в работе использовали широко распространенные в природе темплаты (и микрокристаллы карбоната кальция, и особенно микропузырьки воздуха присутствовали в водах мирового океана задолго до возникновения жизни на Земле), то не исключено, что аналогичный путь формирования многоклеточных организмов мог иметь место в эволюционном процессе. Одноклеточные организмы могли колонизировать микрокристаллы, затем ими могла быть сформирована внеклеточная матрица, возникали межклеточные контакты, а затем продукты жизнедеятельности клеток способствовали растворению и удалению микрокристаллов. Подобный процесс мог происходить и с пузырьками газа, образовавшимися в среде, населенной одноклеточными организмами. Данный процесс был воспроизведен с использованием неорганических темплатов, микропузырьков воздуха и полиэлектролит-функционализированных дрожжей. Бесспорно, по сложности своей организации цитозомы не сравнимы с существующими сегодня простейшими колониальными организмами. Тем не менее простота с которой могут быть получены цитозомы, и в особенности то, что для их получения необходимы широко распространенные в природе микрочастицы, дает основание предположить, что в одном из путей эволюционного возникновения многоклеточности могло иметь место формирование многоклеточных кластеров на основе неорганических микрочастиц.

ВЫВОДЫ

1. Разработан биосовместимый метод функционализации клеток микроорганизмов при помощи пленок полиэлектролитов, допированных наночастицами золота, серебра, оксида железа и углеродными нанотрубками, а также методы прямой магнитной модификации клеток при помощи полимер-стабилизированных магнитных наночастиц.
2. Впервые установлено, что микроорганизмы в растворе являются центрами образования микрокристаллов карбоната кальция (фатерита), образующего мезопористые неорганические микрооболочки на поверхности жизнеспособных клеток.
3. Разработан метод пробоподготовки образцов микроорганизмов для их характеристики при помощи поверхностно-усиленной спектроскопии комбинационного рассеяния (Рамановской спектроскопии), основанный на функционализации микробных клеток при помощи полимерных пленок и наночастиц благородных металлов.
4. Показано, что функционализация микроорганизмов при помощи магнитных наночастиц и углеродных нанотрубок позволяет использовать их в качестве биорецепторных элементов электрохимических биосенсоров и микрофлюидных аналитических устройств для определения генотоксичных веществ и гербицидов.

5. Впервые осуществлена магнитная модификация бактерий, экспрессирующих биолюминесцентные маркерные белки (магнетизация клеток-биорепортеров) и продемонстрирована возможность их использования для анализа токсичности многокомпонентных сред.
6. Впервые с использованием функционализированных клеток микроорганизмов и неорганических темплатов получены и охарактеризованы трехмерные многоклеточные кластеры (цитозомы).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

1. Zamaleeva, A.I. A whole-cell amperometric herbicide biosensor based on magnetically functionalised microalgae and screen-printed electrodes / A.I. Zamaleeva, I.R. Sharipova, R.V. Shamagsumova, A.N. Ivanov, G.A. Evtugyn, D.G. Ishmuchametova, **R.F. Fakhrullin** // *Anal. Methods* – 2011. – V. 3. – P. 509-513.
2. Zhang, D. Functionalization of whole cell bacterial reporters with magnetic nanoparticles / D. Zhang*, **R.F. Fakhrullin***, M. Özmen, H. Wang, J Wang, V.N. Paunov, G. Li, W.E. Huang // *Microb. Biotech.* – 2011. – V. 4. – P. 89-97. (* - *contributed equally*).
3. Garcia-Alonso, J. Micro-screening toxicity system based on living magnetic yeast and gradient chips / J. Garcia-Alonso, **R.F. Fakhrullin**, V. N. Paunov, Z. Shen, J. D. Hardege, N. Pamme, S. J. Haswell, G. M. Greenway // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – V. 400. – P. 1009-1013.
4. **Fakhrullin, R.F.** Live celloidosome structures based on the assembly of individual cells by colloid interactions / R.F. Fakhrullin, M.-L. Brandy, O.J. Cayre, O.D. Velev, V.N. Paunov // *Phys. Chem., Chem. Phys.* – 2010. – V. 12. – P. 11912-11922.
5. **Fakhrullin, R.F.** Interfacing living unicellular algae cells with biocompatible polyelectrolyte-stabilised magnetic nanoparticles / R.F. Fakhrullin, L.V. Shlykova, A.I. Zamaleeva, D.K. Nurgaliev, Y.N. Osin, J. García-Alonso, V. N. Paunov // *Macromol. Biosci.* – 2010. – V. 10. – P. 1257–1264.
6. Порфирьева, А.В. Биосенсоры на основе полиэлектролитных комплексов ДНК и электрополимеризованных материалов / А.В. Порфирьева, В.Б. Костылева, А.И. Замалеева, Г.А. Евтюгин, **Р.Ф. Фахруллин**, В.З. Латыпова // *Ученые записки Казанского государственного университета. Серия “Естественные науки”*. – 2010. – Т. 152, №3. – С.123-133.
7. Brandy, M.-L. Directed assembly of yeast cells into living celloidosomes by microbubble templating / M.-L. Brandy, O.J. Cayre, **R.F. Fakhrullin**, O.D. Velev, V.N. Paunov // *Soft Matter* – 2010. – V. 6. – P. 3494 – 3498. (*cover page article*)
8. Garcia-Alonso, J. Rapid and direct magnetization of GFP-reporter yeast for micro-screening systems / J. García-Alonso*, **R.F. Fakhrullin***, V.N. Paunov // *Biosens. Bioelectron.* – 2010. – V. 25. – P. 1816–1819. (* - *contributed equally*).
9. **Fakhrullin, R.F.** A direct technique for preparation of magnetically functionalised living yeast cells / R.F. Fakhrullin, J. Garcia-Alonso, V.N. Paunov // *Soft Matter* – 2010. – V. 6. – P. 391 - 397.
10. Замалеева, А.И. Микроскопические методы для характеристики наномодифицированных клеток микромицетов / А.И. Замалеева, Ф.К. Алимова, Д.Г. Ишмухаметова, **Р.Ф. Фахруллин** // *Ученые записки Казанского государственного университета. Серия “Естественные науки”*. – 2010. – Т. 152, №1. – С. 110 - 120.

11. Zamaleeva, A.I. Polyelectrolyte-mediated assembly of multi-walled carbon nanotubes on living yeast cells / A.I. Zamaleeva, I.R. Sharipova, A.V. Porfireva, G.A. Evtugyn, **R.F. Fakhrullin** // *Langmuir* – 2010. – V. 26, № 4. – P. 2671–2679.
12. Kahraman, M. Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering / M. Kahraman, A.I. Zamaleeva, **R.F. Fakhrullin**, M. Culha // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2009. – V. 395. – P. 2559–2567.
13. **Fakhrullin, R.F.** Hybrid cellular–inorganic core–shell microparticles: encapsulation of individual living cells in calcium carbonate microshells / R.F. Fakhrullin, R. T. Minullina // *Langmuir* – 2009. – V. 25, № 12. – P. 6617–6621.
14. **Fakhrullin, R.F.** Magnetically responsive calcium carbonate microcrystals / R.F. Fakhrullin, A.G. Bikhmullin, D.K. Nurgaliev // *ACS Appl. Mater. Interfaces* – 2009. – V. 1, № 9. – P. 1847–1851.
15. Замалеева, А.И. Наномодифицированные бактерии: детекция единичных клеток методом поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии / А.И. Замалеева, М. Кахраман, М. Чулха, **Р.Ф. Фахруллин** // *Ученые записки Казанского государственного университета. Серия “Физико-математические науки”*. – 2009. – Т. 151, № 1. – С. 82-90.
16. **Fakhrullin, R.F.** Fabrication of living cellosomes of rod-like and rhombohedral morphologies based on magnetically responsive templates / R.F. Fakhrullin, V.N. Paunov // *Chem. Commun.* – 2009. – P. 2511-2513.
17. **Fakhrullin, R.F.** Living fungi cells encapsulated in polyelectrolyte shells doped with metal nanoparticles / R.F. Fakhrullin, A.I. Zamaleeva, M.V. Morozov, D.I. Tazetdinova, F.K. Alimova, A.K. Hilmutdinov, R.I. Zhdanov, M. Kahraman, M. Culha // *Langmuir* – 2009. – V. 25, № 8. – P. 4628-4634.
18. **Fakhrullin R.F.** Quartz crystal microbalance immunosensor for the detection of antibodies to double-stranded DNA / R.F. Fakhrullin, V.G. Vinter, A.I. Zamaleeva, M.V. Matveeva, R.A. Kourbanov, B.K. Temesgen, D.G. Ishmuchametova, Z.I. Abramova, O.A. Konovalova, M.K. Salakhov // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – V. 388. – P. 367-375.

Патенты

1. «Construction and application of magnetic nanoparticles (MNPs) coated whole cell biosensors» Y. Zeng, W.E. Huang, D. Zhang, **R.F. Fakhrullin**, M. Özmen, V.N. Paunov, Peoples Republic of China patent application № ZL201010513790.5 (2010)
2. «Способ модификации живой клетки». А.И. Замалеева, Ф.К. Алимова, Р.Ф. Фахруллин. Патент РФ № 2377310. – 2009. – Бюл. №36.

Глава в учебном пособии

1. **Фахруллин, Р.Ф.** Биомиметика – имитация биологических систем и устройств в нанодиапазоне / Р.Ф. Фахруллин// *Сборник учебно-методических материалов для слушателей Всероссийской школы-семинара «Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы»*, изд-во БелГУ, - 2010. С. 55-59.

Статьи в сборниках материалов конференций

1. **Fakhrullin, R.F.** Hybrid biomimetic structures based on inorganic nanoparticles, synthetic polymers and living cells / First International Conference of Young Scientists “Chemistry and Chemical Technology”: proceedings, Lviv, Ukraine, - 2010. – P. 200-201.
2. Tarn, M.D. Magnetically actuated particle-based procedures in continuous flow / M.D. Tarn, S.A. Peyman, **R.F. Fakhrullin**, A. Iles, V.N. Paunov, N. Pamme // 14th

International Conference “Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences”: proceedings, Groningen, The Netherlands, - 2010, - P. 1679-1681.

3. Морозов М.В. Спектроскопический и морфологический анализ наномодифицированных клеток грибов / М.В. Морозов, А.И. Замалеева, Д.И. Тазетдинова, **Р.Ф. Фахруллин**, М.Э. Сибгатуллин, Ф.К. Алимова, А.Х. Гильмутдинов, М.Х. Салахов // XIV международная молодежная научная школа «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия»: сб. материалов, Казань, - 2010. – С.101-104.
4. Замалеева, А. И. Модификация микроорганизмов наночастицами для их детекции методом поверхностно-усиленной Рамановской спектроскопии / А.И. Замалеева, М. Kahraman, М. Çulha, **Р.Ф. Фахруллин** // XII международная молодежная научная школа «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия»: сб. материалов, Казань, - 2008. – С. 157-160.

Тезисы в сборниках материалов конференций

1. Коннова, С.А. Функциональные искусственные свободно плавающие живые биопленки: получение и характеристика / С.А. Коннова, А.И. Замалеева, **Р.Ф. Фахруллин** // Всероссийская школа-семинар «Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы»: сб. тез., Белгород, - 2010. – С. 61-62.
2. Коннова, С.А. «Симбиотические» искусственные биопленки / С.А. Коннова, А.И. Замалеева, **Р.Ф. Фахруллин** // III Всероссийский конгресс «Симбиоз-Россия - 2010»: сб. материалов, Нижний Новгород, - 2010. – С.58-59.
3. Минуллина, Р.Т. Живые клетки в неорганических оболочках: биоимитирующая инкапсуляция / Р.Т. Минуллина, **Р.Ф. Фахруллин** // III Всероссийский конгресс «Симбиоз-Россия - 2010»: сб. материалов, Нижний Новгород, - 2010. – С. 63.
4. Шарипова, И. Р. Гибридные микрочастицы, состоящие из живых клеток, полиэлектролитов и углеродных нанотрубок/ И. Р. Шарипова, А.И. Замалеева, **Р.Ф. Фахруллин** // III Всероссийский конгресс «Симбиоз-Россия - 2010»: сб. материалов, Нижний Новгород, - 2010. – С. 82.
5. Бикмуллин, А.Г. Получение и характеристика неорганических микрочастиц различной морфологии, обладающих магнитными свойствами / А.Г. Бикмуллин, Д.К. Нургалиев, **Р.Ф. Фахруллин** // III Всероссийский конгресс «Симбиоз-Россия - 2010»: сб. материалов, Нижний Новгород, - 2010. – С. 163.
6. Бикмуллин, А.Г. Магнитные микрокристаллы карбоната кальция как основа для получения полых микрокапсул / А.Г. Бикмуллин, **Р.Ф. Фахруллин** // Всероссийская школа-семинар «Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы»: сб. тез., Белгород, - 2010. – С. 29-30.
7. Замалеева, А.И. Иммобилизация наноматериалов на поверхность клеток и их характеристика методами микроскопии / А.И. Замалеева, И.Р. Шарипова, Л.В. Шлыкова, М. Kahraman, М. Culha, **Р.Ф. Фахруллин** // IV Международная конференция «Современные достижения бионаноскопии»: сб. материалов, Москва, - 2010. – С.28.
8. Замалеева, А.И. Инкапсуляция живых клеток в полиэлектролитные нанопленки, содержащие металлические наночастицы и углеродные нанотрубки / А.И. Замалеева, И.Р. Шарипова, **Р.Ф. Фахруллин** // Всероссийская конференция «Структура и динамика молекулярных систем»: сб. материалов, Казань, - 2009. – С. 24.

9. **Fakhrullin, R.F.** Fabrication of living yeast cellosomes by polyelectrolyte mediated assembly and magnetically responsive templates / R.F. Fakhrullin, J.R. Garcia-Alonso, V.N. Paunov // Materials Research Society Fall Meeting, Boston, USA, - 2009. – P. X372.
10. Minullina, R.T. The fabrication of hybrid core-shell microparticles: encapsulation of individual living cells in calcium carbonate microshells / R.T. Minullina, **R.F. Fakhrullin** // 13th annual symposium «SymBioSE 2009»: abstracts, Kazan, - 2009 – P. 83.
11. **Fakhrullin, R.F.** Fabrication of living yeast cellosomes by polyelectrolyte mediated assembly and magnetically responsive templates / R. F. Fakhrullin, M.-L. Brandy, O. Cayre, O. D. Velez, V. N. Paunov // 14th UKPCF Annual Meeting «Polymers and colloids»: proceedings, Kingston upon Hull, UK, - 2009. – P. 34.
12. Zamaleeva, A.I. Encapsulation of individual living cells in polymer shells doped with inorganic nanoparticles and microparticles / A.I. Zamaleeva, R.T. Minullina, **R.F. Fakhrullin**, M. Culha, M. Kahraman, F.K. Alimova, J. Garcia-Alonso, V. N. Paunov // 14th UKPCF Annual Meeting «Polymers and colloids»: proceedings, Kingston upon Hull, UK, - 2009. – P. 22-23.
13. Замалеева, А.И. Наномодифицированные микроорганизмы: нанесение полимерных оболочек и наночастиц на поверхность клеточных стенок / А.И. Замалеева, И.Р. Шарипова, **Р.Ф. Фахруллин** // Международная конференция «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений V Кирпичниковские чтения»: сб. материалов, Казань, - 2009. – С. 342.
14. **Фахруллин, Р.Ф.** Живые цитозомы – новый класс биокolloидных микрочастиц / Р.Ф. Фахруллин, В.Н. Паунов // Международная конференция «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений V Кирпичниковские чтения»: сб. материалов, Казань, - 2009. – С. 171.
15. Замалеева, А.И. Поверхностная структура клеток дрожжей, покрытых полимерными тонкими пленками и золотыми наночастицами / А.И. Замалеева, Д.И. Тазетдинова, М.В. Морозов, Ф.К. Алимова, А.Х. Гильмутдинов, **Р.Ф. Фахруллин** // II Международная конференция «Современные достижения бионаноскопии»: сб. материалов, Москва, - 2008. – С. 24.
16. **Fakhrullin, R.F.** Anisotropic microcapsules coated with metal nanoparticles / R.F. Fakhrullin, R.I. Khakimova, A.I. Zamaleeva, Z.I. Abramova, V.N. Paunov // second Saint-Petersburg international conference «NanoBio' 08»: proceedings, St. Petersburg, - 2008. – P. 65-66.
17. **Фахруллин, Р.Ф.** Цитозомы – искусственные многоклеточные структуры / Р.Ф. Фахруллин, О.Ж. Кайре, О.Д. Велев, В.Н. Паунов // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов: сб. материалов, Новосибирск, - 2008. – С. 305.
18. Коннова, С.А. Микросферы и микрокристаллы, содержащие металлические наночастицы / С.А. Коннова, Р.Х. Хакимова, А.И. Замалеева, **Р.Ф. Фахруллин** // II Международная конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии»: сб. материалов, Казань, - 2008. – С. 55.
19. Мамаков, Т.В. Микрокристаллы и микросферы с магнитными свойствами / Т.В. Мамаков, А.Г. Бикмуллин, А.И. Замалеева, **Р.Ф. Фахруллин** // II

- Международная конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии»: сб. материалов, Казань, - 2008. – С. 77.
20. Минуллина, Р.Т. Модификация живых клеток неорганическими микросферами и металлическими наночастицами /Р.Т. Минуллина, Р.К. Вафина, А.И. Замалеева, **Р.Ф. Фахруллин** // II Международная конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии»: сб. материалов, Казань, - 2008. – С. 85.
 21. Замалеева, А.И. Идентификация единичных клеток бактерий, покрытых нанопленками и наночастицами / А.И. Замалеева, М. Kahraman, М. Çulha, **Р.Ф. Фахруллин** // VIII Конференция «Материалы и технологии XXI века»: сб. материалов, Казань, - 2008. – С. 37.
 22. Мамаков, Т.В. Синтез неорганических микрочастиц, содержащих наночастицы / Т.В. Мамаков, Р.Х. Хакимова, С.А. Коннова, А.Г. Бикмуллин, А.И. Замалеева, **Р.Ф. Фахруллин** // VIII Конференция «Материалы и технологии XXI века»: сб. материалов, Казань, - 2008. – С.54.
 23. Минуллина, Р.Т. Инкапсуляция микромицетов в оболочки, содержащие неорганические микросферы и металлические наночастицы / Р.Т. Минуллина, Р.К. Вафина, А.И. Замалеева, **Р.Ф. Фахруллин** // VIII Конференция «Материалы и технологии XXI века»: сб. материалов, Казань, - 2008. – С.56.

Благодарности

Искреннюю благодарность и признательность автор выражает научному консультанту д.б.н. проф. Ольге Николаевне Ильинской за неоценимую помощь и моральную поддержку при подготовке диссертации.

Автор выражает глубокую благодарность проф. д.б.н. Д.Г. Ишмухаметовой (КФУ), д-ру В.Н. Паунову (Университет г. Халл, Англия), д-ру М. Чулхе (Университет Йедитепе, Турция), д-ру В. Хуангу (Университет г. Шеффилд, Англия), д-ру Х. Гарсиа-Алонсо (Университет Республики, Монтевидео, Уругвай), проф. д.х.н. Г.А. Евтюгину (КФУ), проф. д.г.-м.н. Д.К. Нургалиеву (КФУ), проф. д.м.н. А.П. Киясову (КГМУ), проф. д.ф.-м.н. А.Х. Гильмутдинову (КФУ), инж. В.С. Гаврилову (КФУ), к.б.н. И.С. Газизову (МоиН РТ), Н.Н. Кузнецовой (КФУ), д.б.н., Г.Ф. Ситдиковой (КФУ), к.б.н. доц. А.В. Яковлеву (КФУ), Ф. Н. Имамутдинову (КФУ) и к.б.н. А.И. Колпакову (КФУ).

Автор благодарит за техническое содействие М. Кахрамана, К. Татлыдиль, Ю.Н. Осина, д.б.н. В.В. Сальникова, А. Лоури, А. Синклэйр, М. Озмена, д-ра Д. Джанга и М.В. Морозова.

Автор благодарит своих коллег по лаборатории биоматериалов и наноматериалов КФУ – ассистента кафедры биохимии к.б.н. Алсу Замалееву и студентов Ренату Минуллину, Светлану Коннову, Ильзию Шарипову и Марию Дзамукову за помощь и поддержку.

Наконец, но не в последнюю очередь, автор благодарит родителей – Фарида Фахразиевича и Татьяну Зульфатовну, и брата Рамиля за моральную и материальную поддержку, без которых диссертационная работа не могла бы быть выполнена.

Отзывы на автореферат просьба отправлять по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, КФУ, Отдел аттестации научных кадров, Диссертационный совет Д 212.081.08, Ученому секретарю З.И. Абрамовой, факс: (843)238-76-01